



COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

7632-400

THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT: DONG SOO KIM, ET AL.)
SERIAL NO.: 10/020,695) Group Art Unit:
FILED: December 12, 2002) Examiner:
FOR: EXPRESSION VECTOR CONTAINING)
LECTIN GENE REGULATION SITE OF)
MUD LOACH)

RECEIVED

JUN 21 2002

TECH CENTER 1600/2900

CLAIM FOR PRIORITY

The Assistant Commissioner for
Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231


Dear Sir:

Enclosed herewith is a certified copy of the Korean Patent Application No. 2001-75877 filed on December 3, 2001. The enclosed Application is directed to the invention disclosed and claimed in the above-identified application.

Applicants hereby claim the benefit of the filing date of December 3, 2001 of the Korean Patent Application No. 2001-75877, under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

Respectfully submitted,
DONG SOO KIM, ET AL.

CANTOR COLBURN LLP
Applicants' Attorneys

By: 
Daniel F. Drexler
Registration No. 47,535
Customer No. 23413

I HEREBY CERTIFY THAT THIS CORRESPONDENCE
IS BEING DEPOSITED WITH THE UNITED STATES
POSTAL SERVICE AS FIRST CLASS MAIL IN AN
ENVELOPE ADDRESSED TO:
ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D. C. 20231

ON June 10, 2002
DATE OF DEPOSIT
Tennille M. Kien
TYPED OR PRINTED NAME OF PERSON MAKING PAPER OR FEE
SIGNATURE DATE

Date: 6-10-02
Address: 55 Griffin Road South, Bloomfield, CT 06002
Telephone: 860-286-2929



RECEIVED

JUN 21 2002

TECH CENTER 1600/2900

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

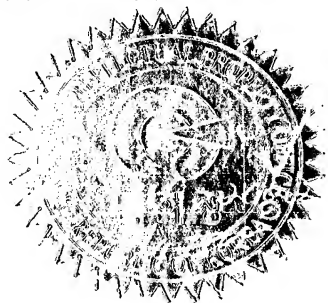
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2001년 제 75877 호
Application Number PATENT-2001-0075877

출원년월일 : 2001년 12월 03일
Date of Application DEC 03, 2001

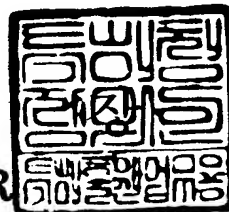
출원인 : 김동수 외 2명
Applicant(s) KIM, DONG SOO, et al.



2002 년 03 월 22 일

특허청

COMMISSIONER



출력 일자: 2002/4/15

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2001. 12. 03
【국제특허분류】	C12N
【발명의 명칭】	미꾸라지 렉틴 유전자의 조절부위를 포함하는 발현벡터
【발명의 영문명칭】	EXPRESSION VECTOR CONTAINING LECTIN GENE REGULATION SITE OF MUD LOACH
【출원인】	
【성명】	김동수
【출원인코드】	4-1998-027462-1
【출원인】	
【성명】	남윤권
【출원인코드】	4-1998-055453-4
【출원인】	
【성명】	노재구
【출원인코드】	4-1998-601837-9
【대리인】	
【성명】	진천웅
【대리인코드】	9-1998-000533-6
【포괄위임등록번호】	2001-060445-1
【포괄위임등록번호】	2001-060447-5
【포괄위임등록번호】	2001-060449-0
【대리인】	
【성명】	조현실
【대리인코드】	9-1998-000525-1
【포괄위임등록번호】	2001-060446-8
【포괄위임등록번호】	2001-060448-2
【포괄위임등록번호】	2001-060450-2
【발명자】	
【성명】	김동수
【출원인코드】	4-1998-027462-1

출력 일자: 2002/4/15

【발명자】

【성명】 남윤권
【출원인코드】 4-1998-055453-4

【발명자】

【성명】 노재구
【출원인코드】 4-1998-601837-9

【심사청구】 청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】 생명공학연구소 (KRIBB)
【수탁번호】 KCTC 10124BP
【수탁일자】 2001.11.22

【미생물기탁】

【기탁기관명】 생명공학연구소 (KRIBB)
【수탁번호】 KCTC 10125BP
【수탁일자】 2001.11.22

【미생물기탁】

【기탁기관명】 생명공학연구소 (KRIBB)
【수탁번호】 KCTC 10126BP
【수탁일자】 2001.11.22

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 18
【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
웅 (인) 대리인
조현실 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	42	면	42,000	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	11	항	461,000	원
【합계】			532,000	원
【감면사유】			개인 (70%감면)	
【감면후 수수료】			159,600	원

출력 일자: 2002/4/15

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_3통

【요약서】

【요약】

본 발명은 형질전환 어류 생산을 위한 미꾸라지 렉틴 유전자의 조절부위(프로모터)를 포함하는 발현벡터에 관한 것으로, 서열 1에 기재된 염기 서열로 표시되는 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절부위, 및 이를 포함하는 발현벡터, 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위 및 미꾸라지의 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터, 그리고 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위 및 잉어의 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터, 그리고 이를 이용한 고성장형을 각각 제공하는데, 이러한 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 발현벡터를 이용하면 미꾸라지와 잉어의 생체내에서 다양한 단백질들을 효과적으로 발현시킬 수 있으며, 특히 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 성장호르몬 발현벡터를 미꾸라지 및 잉어에 이식할 경우, 과도한 성장 가속화로 인한 부작용 없이 안정적인 성장을 향상을 보이고 사료전환효율이 유의적으로 개선된 유용한 형질전환 계통을 생산할 수 있으며, 이로부터 양식 생산성 증대 효과를 얻을 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

미꾸라지, 잉어, 렉틴 유전자 조절부위, 성장호르몬, 프로모터, 발현벡터.

【명세서】

【발명의 명칭】

미꾸라지 렉틴 유전자의 조절부위를 포함하는 발현벡터{EXPRESSION VECTOR CONTAINING LECTIN GENE REGULATION SITE OF MUD LOACH}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 미꾸라지 렉틴 유전자를 포함하는 파아지 DNA의 부분 제한효소 지도 및 서열분석 전략,
- <2> 도 2a~2c는 미꾸라지 렉틴 유전자 및 조절부위의 전체 염기서열,
- <3> 도 3은 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 BFP 발현벡터(pmlectBFP)의 제조 과정을 보여주는 모식도,
- <4> 도 4는 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 CAT 발현벡터(pmlectCAT)의 제조 과정을 보여주는 모식도,
- <5> 도 5는 미꾸라지 간에 이식된 pmlectBFP 및 pmlectCAT의 PCR 분석 결과를 보여주는 사진으로, 도 5a는 pmlectBFP, 도 5b는 pmlectCAT의 경우를 나타내고,
- <6> 도 6은 미꾸라지 간에 이식된 pmlectBFP 및 pmlectCAT로부터 발현하는 mRNA의 RT-PCR 분석 결과를 보여주는 사진으로, 도 6a는 pmlectBFP, 도 6b는 pmlectCAT의 경우를 나타내고,
- <7> 도 7은 미꾸라지 간에 이식된 pmlectBFP 및 pmlectCAT의 발현을 조사한 결과를

나타낸 그래프,

- <8> 도 8은 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현벡터(pmlectmGH)의 제조 과정을 보여주는 모식도,
- <9> 도 9는 잉어 gDNA로부터 성장호르몬 유전자의 PCR 분리를 보여주는 사진,
- <10> 도 10은 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 잉어 성장호르몬 발현벡터(pmlectcGH)의 제조 과정을 보여주는 모식도,
- <11> 도 11은 pmlectmGH가 이식된 부화 8 개월된 형질전환 미꾸라지 및 일반 대조군 미꾸라지의 크기를 비교해서 보여주는 사진,
- <12> 도 12는 pmlectmGH가 이식된 형질전환 미꾸라지 및 일반 대조군 미꾸라지의 사료전환 효율을 나타낸 그래프,
- <13> 도 13은 pmlectcGH가 이식된 군에서 정규분포를 벗어나는 고성장 잉어의 PCR 분석 결과를 보여주는 사진,
- <14> 도 14는 pmlectcGH가 이식된 부화 7 개월된 형질전환 잉어 및 일반 대조군 잉어의 크기를 비교해서 보여주는 사진,
- <15> 도 15는 pmlectcGH가 이식된 형질전환 잉어 및 일반 대조군 잉어의 성장 곡선을 나타낸 그래프.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<16> 본 발명은 형질전환 어류 생산을 위한 미꾸라지 렉틴 유전자의 조절부위(프로모터)를 포함하는 발현벡터에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 미꾸라지 렉틴 유전자의 조절부위를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현벡터 및 잉어 성장호르몬 발현벡터, 그리고 이를 이용하여 고성장 형질전환된 미꾸라지 및 잉어를 생산하는 기술에 관한 것이다.

<17> 어류 유전자 이식은 척추동물 유전자의 발현과 조절을 연구하는 분야에 유용한 모델 시스템을 제공할 수 있음은 물론, 새로운 기능을 획득한 유용 어류 계통을 생산 가능하게 함으로써 기존의 양식기술들로는 해결하지 못하였던 생산성 향상의 한계를 극복할 수 있으리라 여겨지고 있다(Iyengar, A., Muller, F. 및 Maclean, N., 1996. Regulation and expression of transgenes in fish a review. *Transgenic Research* 5, 147-166; Dunham, R.A., Devlin, R.H., 1999. Comparison of traditional breeding and transgenesis in farmed fish with implications for growth enhancement and fitness. In: Murray, J.D., Anderson, G.B., Oberbauer, A.M., McGloughlin, M.N. (Eds), *Transgenic animals in agriculture*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 209-229). 어류 유전자 이식 초기에는 포유류 및 미생물 기원의 유전자 조절부위를 어류 유전자 이식에 사용하여 왔으나, 이들 조절부위들이 어류 세포 내에서 큰 효과를 발휘하지 못한다는 것이 알려지면서 형질전환 어류 개발을 위한 어류 자체의 프

로모터를 확보하고자 하는 노력이 이루어지고 있다.

<18>

현재 양식 생산성 개선을 위한 대부분의 형질전환 어류 개발은 성장호르몬 유전자 이식을 통한 성장형질 개선에 집중되고 있다. 그러나 많은 어종에서 시도되었음에도 불구하고 성공적인 성장을 개선 사례는 아직 일부 어종에서만 국한되어 있다. 더우기 유전자 이식에 사용된 어류 기원의 프로모터 종류 역시 몇몇에 지나지 않고, 그 활용 폭이 매우 제한되어 있는 실정이다. 현재까지 어류에서 성공적인 성장 가속과 형질 개선이 보고된 대표적인 사례는 연어(sockeye salmon)의 MT 프로모터 및 대구(ocean pout)의 AFP 프로모터를 연어 성장호르몬 유전자와 융합하여 연어종(Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagi, C.A., Donaldson, E.M., Shan, R.M., 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature* 371, 209-210; Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., Du, S.J., Hew, C.L., 1995. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 52, 1376-1384; Hew, C.L., Fletcher, G.L. 및 Davies, P.L., 1995. Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *Journal of Fish Biology* 47, 1-19) 또는 틸라피아(Rahman, M.A., Mak, R., Ayad, H., Smith, A., 및 Maclean, N., 1998. Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Research* 7, 357-369.)에 이식한 경우, CMV 프로모터를 틸라피아 성장호르몬 cDNA와

융합하여 틸라피아에 이식한 경우(Martinez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillen, I., Hernandez, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina, J.C., Abad, Z., Sanchez, V., Phillippa, M., Lleonar, R. and Fuente, J., 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5, 62-70), 잉어 베타 액틴 프로모터와 잉어 성장호르몬 유전자 cDNA를 융합하여 잉어에 이식한 경우(Hinitz, Y. 및 Moav, B., 1999. Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 173, 285-296), 그리고 미꾸라지 베타 액틴 프로모터를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현백터를 미꾸라지에 이식한 경우(Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, C.G. 및 Kim, D.S., 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Transgenic Research* 10, 353-362)들로서, 바이러스 기원인 CMV 프로모터가 틸라피아에서 성공을 거둔 사례를 제외하고는 대부분 유상종 또는 동일종의 어류 프로모터 및 조절부위를 성장호르몬 발현백터로 사용한 경우들이다.

<19> 그러나, 이와 같은 성공 사례들에서도 사용된 발현백터와 어종에 따라 그 효과는 일부 제한적인 성장을 개선에서부터 수십 배에 달하는 성장 가속 현상까지 매우 광범위하게 나타나고 있으며, 또한 일부 프로모터들은 그 활성도가 너무 강력하여 성장호르몬의 과도한 발현으로 인해 생리적인 기형 유발과 부작용이 보고된 바도

있다(Dunham, R.A., Devlin, R.H., 1999).

<20> 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)는 우리나라 전 하천에 서식하는 대표적인 주요 담수 어종의 하나로, 우리나라와 일본에서 식용어종으로 크게 각광 받고 있으며 그 시장 규모와 소비는 점차 확대되고 있는 실정이다. 그러나 최근 자연수계의 오염과 하천의 매립 등으로 인해 더 이상 자연 수집에 의한 생산 증대가 불가능하게 되고 양식에 의한 공급 충족이 불가피하게 되었다. 이에 따라, 미꾸라지 양식 생산성의 단기간 개선을 가능하게 할 수 있는 형질전환을 통한 육종이 필요한 실정이다.

<21> 미꾸라지를 대상으로 한 형질전환은 미꾸라지 베타 액틴 유전자 조절부위를 포함한 미꾸라지 성장호르몬 유전자 발현백터를 수정란에 이식하여 성장가속화 현상이 관찰됨으로써 그 가능성을 인정받은 바 있다. 그러나, 형질전환을 위해 사용한 베타 액틴 프로모터가 많은 조직에서 너무 강력한 활성을 나타냄에 따라 일부 형질전환 미꾸라지의 과도한 성장가속과 불필요한 대형화 현상이 관찰된 바, 보다 안정적인 발현 백터 개발이 요구되고 있다(Nam *et al.*, 2001).

<22> 한편, 잉어(*Cyprinus carpio*)는 전세계에서 가장 널리 양식되고 있는 품종 중의 하나로, 우리 나라에서도 지난 20 년 가까이 양식 생산이 이루어지고 있는 어종이다. 그동안 잉어를 대상으로 하여 선발육종을 중심으로 많은 육종학적 시도가 전세계적으로 이루어졌으나 종래의 기술로는 단기간내 더 이상의 획기적인 생산성 증대는 어려운 것으로 나타나고 있다. 따라서, 잉어의 양적 형질의 직접적인 증대가 절실히 요구되고

있으며 이를 위해서는 유용 유전자의 형질전환이 불가피하게 되었다.

<23> 잉어를 대상으로 한 형질전환 연구 역시 일부 연구진에 의해 시도된 바 있다. 예를 들어, 후 등은 인간 성장호르몬 유전자와 생쥐의 MT 프로모터가 융합된 발현벡터를 이용하여 고성장 형질을 유도한 바 있으나(Fu, C., Cui, Y., Hung, S.S.O. 및 Zhu, Z., 1998. Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *Journal of Fish Biology* 53, 115-129) 그 성장률 개선 정도가 미비할 뿐 아니라, 사용된 유전자와 조절부위의 기원이 인간 및 포유류의 것이라는 점이 소비자의 관념적 측면에서 문제점을 갖는다. 또한, 히니츠와 모아브(Hinitz and Moav, 1999) 역시 잉어 베타 액틴 프로모터와 잉어 성장호르몬 유전자 cDNA를 이용하여 형질전환을 시도하였음에도 불구하고 그 성장 개선 효과가 겨울철 실험을 제외하고는 최대 2 배 정도에도 미치지 못하는 등, 고생산성을 창출해 낼 것으로 예상되는 형질전환 기술은 아직 잉어에서 개발되어 있지 못한 실정이다.

<24> 이상과 같은 점을 고려할 때, 미꾸라지와 잉어의 양식 생산성을 향상시키기 위해서는 유용 유전자의 형질전환을 통한 육종이 필요한 실정으로, 이들 미꾸라지와 잉어에 이식된 유전자를 안정적이고 효과적으로 발현시킬 수 있는 형질전환용 발현벡터 및 이를 위한 유전자 조절부위의 개발이 요구되고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<25> 본 발명은 미꾸라지와 잉어에서 고성장형질 획득을 통하여 양식 생산성을 개선

시키기 위한 것으로, 이를 위하여 미꾸라지와 잉어에 이식된 유전자를 안정적이고 효과적으로 발현시킬 수 있는 유전자 조절부위 및 이를 포함하는 형질전환용 발현벡터를 제공하고, 이러한 발현벡터를 이용하여 형질전환된 고성장형질의 미꾸라지 및 잉어를 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성】

- <26> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는, 서열 1에 기재된 염기 서열로 표시되는 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 DNA를 제공한다.
- <27> 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 발현벡터, 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위 및 미꾸라지의 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터, 그리고 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위 및 잉어의 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터를 각각 제공한다.
- <28> 본 발명의 또다른 목적을 달성하기 위한 고성장 형질의 미꾸라지는, 미꾸라지의 수정란에 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위 및 미꾸라지의 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터를 미세 주입하여 부화시키는 단계를 통하여 생산되고, 또한 고성질 형질의 잉어는 잉어의 수정란에 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위 및 잉어의 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터를 미세 주입하여 부화시키는 단계를 통하여 생산된다.
- <29> 본 발명에서는 미꾸라지로부터 렉틴(lectin) 유전자 및 이의 프로모터를 포함하는 조절부위를 순수 분리하고, 이러한 렉틴 프로모터와 다양한 구조 유전자들(예를 들

어 CAT 및 BFP과 같은 리포터 단백질을 코딩하는 유전자들)과의 융합을 통해 리포터 발현백터를 제작하여 생체내 렉틴 프로모터의 발현 유도 능력을 확인하였으며, 특히 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 성장호르몬(GH) 유전자 발현백터를 개발하여 미꾸라지 및 잉어에 이식함으로써 안정적인 고성장 형질을 획득한 계통을 생산하고 이를 통해 양식 생산성 증대를 이룩하도록 하였다.

<30> 다음에, 본 발명에 따른 미꾸라지 렉틴 유전자 프로모터를 포함하는 조절부위, 이를 포함하는 성장호르몬 발현백터, 그리고 이에 따라 형질전환된 고성장 형질의 미꾸라지 및 잉어의 제작 과정을 구체적으로 설명한다.

<31> 1. 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위의 클로닝 및 발현 유도 능력 조사

<32> 먼저, 미꾸라지 간(liver)에서 발현하는 렉틴 cDNA를 탐침으로 이용, 미꾸라지 gDNA 라이브러리로부터 렉틴 유전자와 이의 조절부위를 분리하여 염기서열을 결정한다. 염기서열 분석 결과를 통해 PCR을 수행하여 렉틴 유전자 조절부위를 확보하고, 이를 pGEM-T 이지 벡터에 융합반응시킨 후 박테리아(competent bacteria, XL1-Blue MRF')에 형질전환시키고, 정확한 크기의 PCR 산물(렉틴 조절부위 2.3 Kb)을 포함하는 재조합 플라스미드를 확인한다(pmlectP).

<33> 다음에, 분리된 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 BFP(blue fluorescence protein) 발현백터(pmlectBFP), 및 CAT(bacterial chloramphenicol acetyltransferase) 발현백터(pmlectCAT)를 제작한다.

<34> 이러한 리포터(reporter) 발현벡터(pmlectBFP 및 pmlectCAT)를 미꾸라지 간에 직접 주입한 후, pmlectBFP 및 pmlectCAT의 PCR 분석을 통해 유전자 이식이 성공적으로 이루어진 것을 확인하고, 또한 pmlectBFP 및 pmlectCAT로부터 발현된 mRNA의 RT-PCR 분석을 통해 BFP 및 CAT 유전자의 mRNA가 간에서 성공적으로 발현된 것을 확인한다. 이어서, pmlectBFP이 이식된 간 조직을 대상으로 형광계 (fluorometer)를 이용하여 BFP 단백질의 발현을 확인하고, pmlectCAT이 이식된 간 조직을 대상으로 CAT-ELISA를 수행하여 CAT 단백질의 발현을 확인함으로써, 미꾸라지의 렉틴 프로모터가 미꾸라지 간에서 외래 유전자의 발현을 유도할 수 있음을 확인한다.

<35> 2. 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 성장호르몬 발현벡터의 제작

<36> 위에서 제조한 플라스미드 pmlectP에서 2.3 kb의 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 단편을 회수하여, 미꾸라지 성장호르몬 유전자를 포함하는 pmlGH 플라스미드에 리게이션하여 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현벡터 pmlectmGH를 제조한다.

<37> 한편, 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 잉어 성장호르몬 유전자 발현 벡터를 제조하기 위하여, 먼저 잉어 gDNA로부터 PCR 방법을 통해 2.4 kb의 잉어 성장 호르몬 유전자를 분리하여 TA 클로닝을 통해 pGEM-T-이지 벡터로 클로닝하고(pGEMTcGH) 제한효소 Sac II로 처리하여 2.4 kb의 잉어 성장호르몬 유전자를 회수한 후, 역시 동일한 제한효소로 절단한 pmlectP와 리게이션한다(pmlectcGH).

<38> 3. 고성장 형질의 미꾸라지와 잉어의 생산

<39> (1) 고성장 형질전환 미꾸라지

<40> 본 발명의 미꾸라지 렉틴 유전자 프로모터를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현벡터 pmlectmGH를 미꾸라지 수정란에 미세현미주입하고 부화시켜 고성장 형질의 미꾸라지를 생산한다.

<41> 이들 형질전환군은 정규분포를 벗어나는 높은 체중을 갖는 것으로 관찰되었으며, 대조군의 성장에 비해 평균 7 배의 가속화 현상을 보였다. 또한, 형질전환 제 1 세대 미꾸라지들 중 무작위로 수컷을 선발하여 분석한 결과, 유전자 전달 빈도는 26~42 %로 다양하게 나타나 제 1 세대 F0 형질전환 미꾸라지들의 모자이크(mosaic) 형태를 나타내었다. 형질전환 제 2 세대(F1) 역시 상품크기에 도달하는 시간이 대조군 어체중에 비하여 6~10 배의 가속화 현상을 보였다. 형질전환 F1 미꾸라지(pmlectmGH)를 대상으로 사료전환 효율을 비교한 결과, 일반 미꾸라지들에 비해 약 1.5 배 내외로 개선된 사료전환 효율을 보이는 것으로 나타났다.

<42> (2) 고성장 형질전환 잉어 유도

<43> 본 발명의 미꾸라지 렉틴 유전자 프로모터가 다른 어종인 잉어에서도 활성을 갖는지 여부를 조사하기 위해, 미꾸라지 렉틴 유전자 프로모터와 잉어 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터 pmlectcGH를 잉어 수정란에 이식하고 부화시켜 형질전환 잉어를 생산한다.

<44> 이들 이식군과 대조군의 어체중 분포도를 조사한 결과, 정규분포 곡선에서 벗어난 고속성장 개체의 비율은 전체 미세현미주입된 집단의 23 %에 해당하였다. 또한, 부화 후 4 개월째 PCR에 의해서 형질전환이 재확인된 F0 개체들과 대조군의 성장률을 조사한 결과, 두 집단 간의 누적 생존율에는 유의적인 차이가 없었으며 모두 95 % 이상의 생존율을 보였다. 그리고, 형질전환된 잉어군에서는 대조군에 비하여 유의적인 어체중 증가 현상이 실험 개시 30 일부터 관찰되었으며, 최종 7 개월째에는 평균 무게가 3 배 이상 차이가 났다.

<45> 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐 이들만으로 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

<46> [실시예 1] 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위의 클로닝 및 발현 유도 능력 조사

<47> (1) 미꾸라지 gDNA 라이브러리로부터 렉틴 유전자 및 조절부위 분리

<48> ① 미꾸라지 간(liver)에서 발현하는 EST 클론 중 보고되어 있는 렉틴 유전자 cDNA와 높은 유사성을 갖는 EST 클론을 선별하여(GenBank = <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), gDNA 라이브러리에서 렉틴 유전자를 분리하기 위한 탐침으로 사용하였다. 탐침은 PCR 방법을 이용, 다이곡시게닌 11-dUTP(digoxigenin 11-dUTP) (Roche Molecular Biochemicals, Germany)로 표지하여 라이브러리 검색에 사용하였다.

<49> ② 미꾸라지 genomic DNA 라이브러리를 포함하는 파아지의 적정량(titer)을 조

정하여 숙주세포 KW251 균주로의 감염을 통해 총 500,000 개의 플라크(plaque)가 형성 되도록 한 후, 이들을 대상으로 위 ①의 탐침을 이용하여 필터 하이브리드화 (filter hybridization)를 수행하였다. Genomic DNA 라이브러리에서 선발을 위해, 람다 파아지 플라크(lambda phage plaque) 클론을 150 mm 페트리디쉬에 준비되어 있는 배지에 50,000 개씩 10 개를 준비하고, 준비된 genomic 클론을 나일론 멤브레인으로 옮겨 필터 하이브리드화를 통한 스크리닝을 수행하였다. 필터 하이브리드화는 로슈(Roche)사의 키트(Non-radioactive digoxigenin labelling and detection kit)를 이용하여 수행하였으며, 최초 1 차 스크리닝에 의해 선발된 클론들을 대상으로 각 3 회 반복 선발을 수행하여 최종 하이브리드화 선발에서 100 % 양성 신호를 보이는 클론들을 최종 선발하였다.

<50>

③ 선발 실험 결과 최종 6 개의 양성 클론들을 선발하였으며 이들로부터 단일 양성 파아지 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 BamHI, EcoRI, HindIII, SacI, KpnI, XbaI, XhoI, PstI 등을 포함하는 다양한 제한효소의 단일 또는 적절한 조합으로 절단한 후, 전기영동상에 나타난 절편의 크기를 비교하여 제한효소 지도를 작성하였다. 파아지 DNA에서 렉틴 유전자를 포함하는 단편을 확보하기 위해 위 ①의 탐침을 이용하여 서던 블롯(Southern blot)을 수행하였다. 확인된 렉틴 유전자 단편을 제한효소 처리를 통해 회수하고 pBlueScript II KS (-)(Stratagene, USA) 플라스미드 벡터 내로 서브클로닝(subcloning)하였다.

<51> ④ 서브클로닝된 렉틴 유전자의 제한효소 지도 작성을 위해 위 ③과 같이 제한 효소 지도를 작성하고, 이를 기본으로 엑소뉴클레아제(Exonuclease) III를 이용한 방법(Erase-a-base)으로 말단의 한쪽 방향이 순차적으로 결손된 단편들을 다시 서브클로닝하여 염기서열을 분석하였다. 도 1은 미꾸라지 렉틴 유전자를 포함하는 파아지 DNA의 부분 제한효소 지도 및 서열분석 전략을 나타낸 것이다.

<52> 결손 단편들을 대상으로 ABI 377 자동 염기서열 분석기(PE Biosystem, USA)와 빅다이 터미네이터 시퀀싱 키트(Bigdye Terminator Sequencing kit)(PE Biosystem, USA)를 이용하여 각각 서브클로닝된 단편들의 염기서열을 분석하였으며, 각 단편들의 염기서열 정보를 염기서열 분석 소프트웨어 프로그램(Sequencher; GeneCodes, USA)을 이용하여 전체 염기서열로 연결시켰다.

<53> 연결된 염기서열의 유전자은행(GenBank) 검색을 통해 아미노산 서열 및 유전자 정보를 분석한 결과, 본 발명에서 분리된 유전자는 C-타입 렉틴인 것으로 나타났다. 도 2는 미꾸라지 렉틴 유전자 및 조절부위의 전체 염기서열을 나타낸 것으로, 밑줄친 부분이 본 발명의 발현벡터에 사용되는 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절부위이다. 서열 1은 이와 같은 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절부위를 나타내고, 서열 2는 미꾸라지 렉틴 유전자 및 조절부위의 전체 염기서열을 나타낸 것이다.

<54> ⑤ 렉틴 유전자 조절부위를 확보하기 위해, 상기 염기서열 분석 결과를 통해 번역개시 코돈인 ATG의 존재를 확인하고 파아지 DNA의 제한효소 지도 정보를 바탕으로

번역개시 코돈을 포함하여 5'쪽 상위 부분을 플라스미드 pBS II KS 내로 서브클로닝한 후 위 ④와 같이 염기서열을 분석하였다(도 2). 요구되는 2.32 kb의 5'-upstream 조절 부위만을 분리해내기 위해, 전위(forward) 프라이머 lecP 1F와 역위(reverse) 프라이머 lecP 1R을 다음과 같이 결정하고, 렉틴 유전자와 조절부위를 포함하는 파아지 DNA를 대상으로 PCR을 수행하였다.

<55> lecP 1F: 5'-AAG AGT GTG GCT TTG ACC C-3' (서열 8)

<56> lecP 1R: 5'-GGA AAA GTG ACA CAT CTG C-3' (서열 9)

<57> PCR 중합반응액과 조건은 다음과 같다.

<58> (PCR 중합반응액 조성)

<59>	증류수	28 μ l
<60>	15 mM MgCl ₂ 함유 10X PCR 완충액(Roche 사)	5 μ l
<61>	10X dNTPs(각 2.5 mM)	5 μ l
<62>	5 uM 전위(forward) 프라이머 lecP 1F	5 μ l
<63>	5 uM 역위(reverse) 프라이머 lecP 1R	5 μ l
<64>	Taq DNA 폴리머라제(Roche, 5 unit/ μ l)	1 μ l
<65>	주형 DNA(50 ng/ μ l)	1 μ l

<66> (PCR 조건)

<67> 1 사이클: 초기 변성 94 °C 2 분.

<68> 30 사이클: 변성 94 °C 1 분, 어닐링 60 °C 30 초, 연장 72 °C 1 분 30 초.

<69> 1 사이클: 최종 연장 72 °C 5 분.

<70> ⑥ 조절부위만을 플라스미드 벡터에 클로닝하기 위해 PCR 정제 시스템(PCR purification system, Promega 사)을 이용하여 PCR 산물로부터 잔여 프라이머와 dNTPs 들을 제거한 후, pGEM-T 이지 벡터(pGEM-T easy vector, Promega 사)와 리게이션을 수행하였다. 융합반응을 위해 다음의 반응액을 제조하여 4 °C에서 12 시간 동안 반응시켰다.

<71> (융합 반응액 조성)

<72> 2X T4 리가제 완충액 5 μ l

<73> pGEM-T 이지 벡터 1 μ l(50 ng)

<74> PCR 산물 1 μ l(100 ng)

<75> 증류수 2 μ l

<76> T4 DNA 리가제 1 μ l

<77> 반응이 완료되면 리게이션 혼합물 5 μ l를 취하여 박테리아(competent bacteria, XL1-Blue MRF')에 CaCl₂ 방법으로 형질전환시키고 정확한 크기의 PCR 산물(렉틴 조절부위 2.3 Kb)을 포함하는 재조합 플라스미드를 확인, pmlectP라 명명하였다.

<78> 이와 같이 제조된 플라스미드 pmlectP는 대장균 숙주세포 *E. coli* XL1-Blue MRF'에 형질전환시켜 생명공학연구소에 2001년 11월 22일자 기탁번호 KCTC 10124BP로

서 기탁되어 있다.

<79> (2) 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 리포터 유전자 발현벡터의 제조

<80> ① 상품 BFP(blue fluorescence protein) 발현벡터 pQBI50(Takara)로부터 제한 효소 Apa I 와 Sac II 절단을 통해 0.8 Kb의 BFP 유전자 단편을 회수한 후, pGEM T 이지 벡터의 Apa I 및 Sac II 위치로 옮겼다. 이 플라스미드를 Sal I 과 Sac II로 절단하고, 위에서 제작한 pmlectP로부터 Sal I 및 Sac II 절단을 통해 미꾸라지 렉틴 조절부위를 회수한 후, 이들간의 리게이션을 통해 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위와 BFP 형광단백질 유전자를 포함하는 발현벡터 pmlectBFP(6.2 kb)를 제작하였다. 도 3은 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 BFP 발현벡터(pmlectBFP)의 제조 과정을 보여주는 모식도이다.

<81> ② CAT(bacterial chloramphenicol acetyltransferase) 유전자를 포함하는 pBS II KS 플라스미드를 Sac II와 Spe I 로 절단하고, 동일 효소를 이용하여 pmlectP로부터 Sac II /Spe I 로 절단된 렉틴 조절부위를 회수한 후, 이들간의 리게이션을 통해 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위와 CAT 단백질 유전자를 포함하는 발현벡터 pmlectCAT(6.1 kb)를 제작하였다. 도 4는 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 CAT 발현벡터(pmlectCAT)의 제조 과정을 보여주는 모식도이다.

<82> (3) 미꾸라지 간에 직접 주입(direct injection)을 통한 렉틴 유전자 조절부위의 발현 유도 능력 확인

<83> ① 위에서 제작된 리포터 발현벡터(pmlectBFP 및 pmlectCAT)를 이용하여 본 발명의 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위의 유전자 발현 유도능력을 조사하였다. 먼저, 플라스미드 DNA pmlectBFP를 대량 분리한 후, 50 μ l의 인산염 완충액(PBS, pH 7.4) 내에 20 및 40 μ g의 DNA가 녹아있도록 농도를 조절하여 준비하였다. 해부학적 기법을 통해 미꾸라지 복부를 절개한 후, 0.5 cc 1/26 G 주사기를 이용하여 간 조직에 20 및 40 μ g의 pmlectBFP 플라스미드 DNA(50 μ l)를 주입하였다. 주입 후 수술용 실과 해부기법을 이용하여 절개된 부분을 다시 복개하였다. 각 DNA 농도별로 4 마리씩 이식하였으며, 대조군으로는 PBS만을 50 μ l씩 주입한 4 마리를 설정하였다. 이식이 완료된 개체들은 25 $^{\circ}$ C 항온 수조로 옮겨 분석에 사용하였다.

<84> 동일한 방법으로 pmlectCAT 유전자 역시 미꾸라지 간에 이식하여 렉틴 유전자 조절부위의 발현 유도 능력 분석에 사용하였다.

<85> ② 주사 4 일 후 다시 해부학적 기법을 통해 주사된 개체들로부터 간 조직을 적출하였다. 분석하고자 하는 간 조직의 시료에 주입된 플라스미드들이 존재하는지 여부를 확인하기 위해, 소량의 조직 일부(10 mg)를 각각의 시료로부터 채취하고 DNA를 추출한 후 PCR을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 프라이머는 BFP 유전자 검출을 위해 BFP 1F 및 BFP 1R을, 그리고 CAT 유전자 검출을 위해 CAT 1F 및 CAT 1R을 사용하였다.

<86> BFP 1F: 5'-GGC CAC AAG TTC TCT GTC AGT G-3' (서열 10)

<87> BFP 1R: 5'-GGG CAG ATT GTG TGG ACA GG-3' (서열 11)

- <88> CAT 1F: 5'-CTA TAA CCA GAC CGT TCA GC-3' (서열 12)
- <89> CAT 1R: 5'-CGC CCC GCC CTG CCA CTC ATC GCA G-3' (서열 13)
- <90> PCR 반응은 두 유전자 모두 동일하게 아래와 같은 조건에서 수행하였다.
- <91> (PCR 반응액 조성)
- | | | |
|------|---|------------------|
| <92> | 증류수 | 28 μl |
| <93> | 15 mM MgCl_2 함유 10X PCR 완충액(Roche 사) | 5 μl |
| <94> | 10X dNTPs(각 2.5 mM) | 5 μl |
| <95> | 5 uM 전위(forward) 프라이머 | 5 μl |
| <96> | 5 uM 역위(reverse) 프라이머 | 5 μl |
| <97> | Taq DNA 폴리머라제(Roche, 5 unit/ μl) | 1 μl |
| <98> | 주형 gDNA(200 ng/ μl) | 1 μl |
- <99> (PCR 조건)
- <100> 1 사이클: 초기 변성 94 °C 2 분.
- <101> 30 사이클: 변성 94 °C 1 분, 어닐링 58 °C 1 분, 연장 72 °C 1 분 30 초.
- <102> 1 사이클: 최종 연장 72 °C 3 분.
- <103> 도 5는 미꾸라지 간에 이식된 pmlectBFP 및 pmlectCAT의 PCR 분석 결과를 보여주는 사진으로, 도 5a는 pmlectBFP, 도 5b는 pmlectCAT의 경우이다. 여기에서, M은 1 kb 래더(Gibco BRL)이고, 도 5a의 레인 1~3은 PBS만을 주입한 대조군, 레인 4~6은

pmlectBFP 20 μ g을 주입한 조직, 그리고 레인 7~10은 pmlectBFP 40 μ g을 주입한 조직을 나타내고, 도 5b의 레인 1~3은 PBS만을 주입한 대조군, 레인 4~6은 pmlectCAT 20 μ g을 주입한 조직, 그리고 레인 7~9는 pmlectCAT 40 μ g을 주입한 조직을 나타낸다. 도 5에서 보듯이, 플라스미드 DNA가 주사된 간 조직 모두에서 BFP 또는 CAT 유전자가 증폭된 PCR 산물들이 검출되었으며, 이로써 유전자 이식이 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있다.

<104> ③ BFP 및 CAT mRNA 합성을 확인하기 위해, 간 조직의 절반(약 0.2 g)으로부터 총 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 수행하였다. 조직으로부터 총 RNA를 분리하기 위해 Roche 사의 분리 키트(TriPure isolation kit)를 이용하였으며, 1 μ g의 RNA 당 10 unit의 DNase I (Promega)을 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 처리하여 분리된 RNA 시료내 잔존하는 DNA의 오염을 제거하였다. 반응이 완료되면 DNase 활성을 제거하기 위해 90 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 방치한 후, RNA 1 μ g을 취하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 Roche 사의 1 단계 RT-PCR 시스템(one-step RT-PCR system)을 이용하여, 50 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 역전사 반응(reverse transcription)이 수행되도록 하였고, 곧이어 순차적으로 30 사이클의 PCR 반응이 이루어지도록 하였다. 이때 사용된 프라이머는 위 ②에서와 동일한 것으로 하였다.

<105> 도 6은 미꾸라지 간에 이식된 pmlectBFP 및 pmlectCAT로부터 발현하는 mRNA의 RT-PCR 분석 결과를 보여주는 사진으로, 도 6a는 pmlectBFP, 도 6b는 pmlectCAT의 경

우이다. 여기에서, M은 1 kb 래더와 크기 표지(Gibco BRL)이고, 도 6a의 레인 1~3은 PBS만을 주입한 대조군, 레인 4~6은 pmlectBFP 20 μ g을 주입한 조직, 그리고 레인 7~9는 pmlectBFP 40 μ g을 주입한 조직을 나타내고, 도 6b의 레인 1 및 2는 PBS만을 주입한 대조군, 레인 3~5은 pmlectCAT 20 μ g을 주입한 조직, 그리고 레인 6~8은 pmlectCAT 40 μ g을 주입한 조직을 나타낸다. 도 6에서 보면, BFP 및 CAT 유전자의 mRNA가 간에서 성공적으로 발현되었음을 알 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 렉틴 유전자 조절부위의 리포터 유전자 발현 유도 능력이 mRNA 수준에서 확인되었다.

<106>

④ 간에 이식된 pmlectBFP 및 pmlectCAT의 발현을 통해 BFP 및 CAT 단백질이 합성될 수 있는가를 조사하였다. 먼저, pmlectBFP의 발현은 pmlectBFP가 이식된 간 조직을 대상으로 형광계(fluorometer)를 이용하여 단백질 발현 여부를 확인하였다. 즉, 간 조직 0.1 g을 추출용 완충액(extraction buffer) 2 ml(200 mM 트리스 pH 8.0, 0.1 mM PMSF)에서 균질화(homogenization)시키고 원심분리(5000 rpm, 10 분)하여 마쇄되지 않은 조직과 마쇄된 찌꺼기를 제거한 후, 상등액을 취하여 파장 460 nm에서 형광 세기를 검출하였다.

<107>

또한, pmlectCAT의 발현을 확인하기 위해서, pmlectCAT이 이식된 간 조직을 대상으로 CAT-ELISA를 수행하였다. 즉, 간 조직 0.1 g을 위의 추출용 완충액으로 균질하게 마쇄한 후 원심분리를 통해 상등액을 취하여 ELISA를 수행하였다. ELISA는 폴리클로날 호스래디쉬 CAT-항체(polyclonal horseradish CAT-antibody)를 포함하는 CAT-

ELISA 키트(Roche 사)를 이용하였으며, ELISA 반응이 완료되면 파장 405 nm에서 마이크로웰 플레이트 리더(microwell plate reader)를 이용하여 CAT 단백질 발현을 검출하였다.

<108> 도 7은 미꾸라지 간에 이식된 pmlectBFP 및 pmlectCAT의 발현을 조사한 결과를 나타낸 그래프이다. 여기에서 보면, BFP 및 CAT 이식군 모두에서 유의적인 BFP 및 CAT 단백질 발현을 확인할 수 있으며, 따라서 본 발명의 렉틴 프로모터가 미꾸라지 간에서 효과적으로 외래 유전자의 발현을 유도할 수 있음을 알 수 있다.

<109> [실시예 2] 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 성장호르몬 유전자 발현벡터의 제작

<110> (1) 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현벡터(pmlectmGH)의 제작

<111> 위에서 제작된 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 pmlectP 플라스미드를 Sac II 및 Spe I 으로 절단하여 2.3 kb의 렉틴 조절부위를 회수하고, 미꾸라지 성장호르몬 유전자를 포함하는 pBS II KS 플라스미드(pmlGH)도 마찬가지로 Sac II 및 Spe I 으로 절단한 후, 이들 간에 리게이션을 수행함으로써 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현벡터 pmlectmGH(7.4 kb)를 제조하였다. 도 8은 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현벡터(pmlectmGH)의 제조 과정을 보여주는 모식도이다.

- <112> 이와 같이 제조된 플라스미드 pmlectmGH는 대장균 숙주세포 *E. coli* XL1-Blue MRF'에 형질전환시켜 생명공학연구소에 2001년 11월 22일자 기탁번호 KCTC 10126BP로서 기탁되어 있다.
- <113> (2) 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 잉어 성장호르몬 발현벡터(pmlectcGH)의 제작
- <114> ① 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 잉어 성장호르몬 유전자 발현벡터를 제조하기 위하여, 먼저 잉어 genomic DNA로부터 PCR 방법을 통해 잉어 성장호르몬 유전자를 분리하였다. 종래에 보고되어 있는 잉어 성장호르몬 유전자 염기서열 정보를 바탕으로 전위 프라이머 cGH 1F 및 역위 프라이머 cGH 1R을 다음과 같이 합성하고, 다음의 PCR 반응조건에 따라 PCR을 수행하였다. 이 때, 클로닝을 용이하게 하기 위하여 cGH 1F의 5'쪽에 SacII 절단 인식 부위를 갖도록 프라이머를 합성하였다.
- <115> cGH 1F: 5'-CCG CGG ACA AAC ATT CAC AAG CTC TTA ACT AAG-3' (서열 14)
- <116> (Sac I)
- <117> cGH 1R: 5'-TTC TCT ATT AAA GTT TTA AAT TGC ATC CA-3' (서열 15)
- <118> (PCR 반응액 조성)
- | | | |
|-------|---|------------|
| <119> | 증류수 | 28 μ l |
| <120> | 15 mM MgCl ₂ 함유 10X PCR 완충액(Roche) | 5 μ l |
| <121> | 10X dNTPs(각 2.5 mM) | 5 μ l |

<122> 5 uM 전위 프라이머 cGH 1F 5 μ l

<123> 5 uM 역위 프라이머 cGH 1R 5 μ l

<124> Taq DNA 폴리머라제(Roche 5 unit/ μ l) 1 μ l

<125> 주형 DNA(1 μ g/ μ l) 1 μ l

<126> (PCR 조건)

<127> 1 사이클: 초기 변성 94 $^{\circ}$ C 2 분.

<128> 30 사이클: 변성 94 $^{\circ}$ C 1 분, 어닐링 58 $^{\circ}$ C 1 분, 연장 72 $^{\circ}$ C 1 분 30 초.

<129> 1 사이클: 최종 연장 72 $^{\circ}$ C 5 분.

<130> PCR에 의해서 확보된 2.4 kb의 잉어 성장호르몬 유전자 단편을 TA 클로닝을 통해 pGEM-T 이지 벡터(pGEM-T easy vector, Promega 사)로 클로닝하여 pGEMcGH를 제조하였다. 도 9는 잉어 gDNA로부터 성장호르몬 유전자의 PCR 분리를 보여주는 사진이다. 잉어 성장호르몬 유전자의 정확한 증폭 여부를 확인하기 위해, pGEM T-이지 벡터에 클로닝된 PCR 산물의 염기서열을 분석함으로써 증폭의 오류가 없었음을 확인하였다.

<131> ② 잉어 성장호르몬 유전자를 포함하는 pGEMcGH를 SacII로 절단하여 잉어 성장호르몬 유전자 2.4 kb를 회수하고, 역시 pmlectP를 동일 제한효소로 절단한 후 이들 간에 리게이션을 수행함으로써, 미꾸라지 렉틴 프로모터와 잉어 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터 pmlectcGH(7.7 kb)를 제작하였다. 도 10은 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 잉어 성장호르몬 발현벡터(pmlectcGH)의 제조 과정을 보여주는

모식도이다.

<132> 이와 같이 제조된 플라스미드 pmlectcGH는 대장균 숙주세포 *E. coli* XL1-Blue MRF'에 형질전환시켜 생명공학연구소에 2001년 11월 22일자 기탁번호 KCTC 10125BP으로서 기탁되어 있다.

<133> [실시예 3] 고성장 형질의 미꾸라지와 잉어의 생산

<134> (1) 고성장 형질전환 미꾸라지 유도

<135> 본 발명의 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 미꾸라지 성장호르몬 발현벡터 pmlectmGH를 미꾸라지 수정란에 이식하여 고성장 형질의 유도 능력을 확인하였다. 그 실험 및 분석에는 다음과 같다.

<136> ① 미세현미주입을 위해, pmlectmGH를 순수분리하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 미세현미주입용 완충용액(10 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH. 8.0; 0.05 % 페놀 레드)을 준비하였다. 성숙한 미꾸라지 암컷, 수컷들을 대상으로 6~8 IU/g의 농도로 HCG(human chorioninc gonadotropin)을 복강 주사하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12 시간 동안 방치하였다. 12 시간후 수컷의 복부를 절개하고 정소를 적출, 세절하고 0.85 % NaCl 용액에 1×10^8 정자세포/ ml 로 희석하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 암컷으로부터 복부 압박법을 이용하여 난을 채취하고 알 1000 개당 희석정액 300 μl 를 첨가하였다. 희석 정액과 난을 잘 섞어준 후 준비된 25 $^{\circ}\text{C}$ 의 물 1 ml 를 첨가하여 수정시키고, 50 ml 의 25 $^{\circ}\text{C}$ 물로 2 회 세란한 후 준비된 25 $^{\circ}\text{C}$ 향온 수조로 옮겼다. 수정난의 난할이 시작되어 제 1 세포

기에 도달하면 수온을 12 °C로 낮추어 난할을 지연시키고 상기 완충용액에 준비된 pmlectmGH를 미세현미주입하였으며, 미세현미주입이 완료된 난은 다시 25 °C 항온 부화조로 옮겨 부화시기까지 수용하였다.

<137> ② 부화자어들을 2 개월까지 사육하고 부화 2 개월째 PCR 분석을 통해 pmlectmGH가 이식된 형질전환 미꾸라지를 선발하였다. PCR 분석을 위해 사용된 프라이머들은 미꾸라지 렉틴 프로모터에 상보적인 전위 프라이머 lectP 2FW와 미꾸라지 성장 호르몬 유전자에 상보적인 역위 프라이머 mIGH 3R를 이용하였으며, 그 반응 조건은 다음과 같다.

<138> lecP 2FW: 5'-GTT ATG GAG TCC CTC CCA A-3' (서열 16)

<139> mIGH 3R: 5'-CAG CCA GCT GGT GCA GGT G-3' (서열 17)

<140> (PCR 반응액 조성)

<141> 증류수 28 μ l

<142> 15 mM MgCl₂ 함유 10X PCR 완충액(Roche) 5 μ l

<143>	10X dNTPs(각 2.5 mM)	5 μ l
-------	---------------------	-----------

<144> 5 uM 전위 프라이머 lectP 2F 5 μ l

<145> 5 uM 역위 프라이머 mlGH 3R 5 μ l

<146> Taq DNA 폴리머라제 (Roche, 5 unit/ μ l) 1 μ l

<147> 주형 DNA(1 ug/ μ l) 1 μ l

- <148> (PCR 조건)
- <149> 1 사이클: 초기 변성 94 ℃ 2 분.
- <150> 30 사이클: 변성 94 ℃ 1 분, 어닐링 58 ℃ 1 분, 연장 72 ℃ 1 분 30 초.
- <151> 1 사이클: 최종 연장 72 ℃ 5 분.
- <152> 다음 표 1은 pmlectmGH가 이식된 미꾸라지군과 일반 미꾸라지의 대조군에서 부화 2개월 쯤의 어체중 분포를 나타낸 것이다.

<153> 【표 1】

어체중	미꾸라지 수	
	대조군	pmlectmGH 주입
0.0~1.0	144	7
1.1~2.0	221	138
2.1~3.0	365	209
3.1~4.0	109	121
4.1~5.0	12	38
5.1~6.0	0	16
6.0~7.0	0	96
7.1~8.0	0	11
8.1~9.0	0	14
9.1~10.0	0	18
10.1~12.0	0	15
12.1~14.0	0	24
14.1~16.0	0	18
16.1~18.0	0	1
18.1~20.0	0	1
20.1~22.0	0	0
22.1~24.0	0	1
24.1~26.0	0	0
26.1~28.0	0	0
28.1~30.0	0	0
30.1~32.0	0	0
32.1~34.0	0	0
34.1~	0	0
합계	851	799

- <154> 여기에서 보듯이, 대조군에서는 어체중 양상이 전형적인 정규분포를 보인 반

면, pmlectmGH가 이식된 군에서는 정규분포를 벗어나는 높은 체중을 갖는 개체들이 관찰되었다. 그리고 높은 체중을 갖는 미꾸라지 대부분은 모두 형질전환 개체인 것으로 판명되어, 본 발명의 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 성장호르몬 발현벡터에 의해 성장 가속화가 가능한 것으로 나타났다.

<155>

한편, 부화 2 개월째의 위에서 확인된 형질전환 미꾸라지들과 동일 마리수의 대조군 미꾸라지들을 서로 다른 색의 형광 표지(Northwest Marine Technology Inc., USA)를 수행하여 동일 사육조에 수용하였다. 이때 수온은 25 ℃로 하였으며 상품 잉어 사료(39 % 단백질)를 공급하면서 부화후 9 개월까지 어체중 증가를 비교 분석하였다. 그 결과, 형질전환군이 대조군의 평균 성장에 비해 각각 평균 7 배의 가속화 현상을 보여, 실험종료시 대조군의 평균 어체중이 12 ± 2 g인 반면 pmlectmGH 군은 평균 89 ± 14 g의 어체중을 나타내었다. 도 11은 pmlectmGH가 이식된 부화 8 개월된 형질전환 미꾸라지 및 일반 대조군 미꾸라지의 크기를 비교해서 보여주는 사진이다.

<156>

③ 형질전환 제 1 세대 미꾸라지들 중 무작위로 수컷 7 마리를 선발하여 이식된 유전자가 다음 세대로 전달될 수 있는지를 조사하였다. 즉, 형질전환 수컷 7 마리 및 대조군 일반 미꾸라지 수컷 2 마리로부터 위 ①의 방법대로 각각의 정자 시료를 확보하여 일반 미꾸라지 암컷으로부터 얻은 난과 인공수정시켜, 수정율, 부화율, 초기 생존율 등을 조사하였다. 그 결과, 형질전환 수컷과 수정된 난의 수정률, 부화율 및 초기 생존율은 각각 89~94 %, 83~90 % 및 82~91 %로 나타나 대조군의 수치와 차이가

없었다($p>0.05$). 무작위로 선발된 부화 자어 20~30 미를 대상으로 상기 ②의 방법대로 PCR 분석을 수행하여 유전자 전달 빈도를 조사하고, 그 결과를 표 2에 나타내었다. 다음 표 2는 형질전환 F0 미꾸라지로부터 F1으로 pmlectmGH 유전자의 전달 양상을 나타낸 것이다. 여기에서 초기생존율은 난황흡수까지 부화자어의 생존율을 의미한다.

<157>

【표 2】

실험적 수컷	수정율 (%)	부화율 (%)	초기생존율* (%)	유전자 전달 빈도 (%)
CON M1	91± 4	85± 6	82± 4	0
CON M2	92± 3	89± 4	88± 3	0
TGM#1	93± 5	84± 3	84± 6	27± 4
TGM#2	89± 4	83± 5	88± 3	38± 4
TGM#3	92± 3	90± 5	82± 5	32± 2
TGM#4	94± 3	89± 3	90± 4	42± 1
TGM#5	90± 5	86± 6	91± 5	26± 4

<158>

위 표에서 보면, pmlectmGH가 이식된 형질전환 미꾸라지 제 1 세대 7마리중 5마리가 다음 세대로 유전자를 전달하였으며, 그 유전자 전달 빈도는 26~42 %로 다양하게 나타남으로써 제 1 세대 F0 형질전환 미꾸라지들의 모자이크(mosaic) 형태를 나타내었다.

<159>

④ 형질전환 제 2 세대(F1) 계통별로 상기 ②의 방법에 따라 생산된 6 계통의 형질전환 F1 집단을 대상으로 각 집단별로 1 주, 2 주 및 3 주째에 상위 30 %씩을 선발하여 최종 각 집단별로 60~70 미씩의 고성장 개체들을 확보하였다. 각 계통별로 2 반복구(반복구별 22미)씩 본 어종의 상품크기(10~12 g)까지 성장을 조사한 결과, 6 계통의 형질전환 개체들은 모두 2~3 개월 이내에 상품크기에 도달한 반면, 대조군은 9 개월에 상품크기에 도달하였다. 형질전환군들이 상품크기에 도달하는 시점을 기준으

로 대조군 어체중과 비교시 6 계통은 6~10 배의 가속화 현상을 보였다.

<160>

⑤ 부화 2 개월된 형질전환 F1 미꾸라지(pmlectmGH) 3 계통을 대상으로 일반 미꾸라지와 사료전환 효율을 비교하였다. 즉, 형질전환 미꾸라지 18 마리와 동일 마리수의 일반 미꾸라지들을 서로 다른 3 반복 200 ℓ 수조에 수용하여 잉어 상품 사료를 공급하면서 사육하고, 공급된 사료 무게 1 g 당 어체중 증가량(g)을 측정, 백분율로 환산하여 사료전환 효율을 8 주간 조사하였다. 사육 수온은 25 ℃로 하였으며 순환 여과식 시스템을 이용하여 모든 반복구 수조에 동일 수질의 사육수가 공급되도록 하였다. 사료는 1 일 10 회 오전 9 시부터 오후 7 시까지 10 회 반복 공급하였다.

<161>

도 12는 pmlectmGH가 이식된 형질전환 미꾸라지 및 일반 대조군 미꾸라지의 사료전환 효율을 나타낸 그래프이다. 여기에서 보면 형질전환 미꾸라지들은 일반 미꾸라지들에 비해 반복구별로 약 1.5 배 내외로 개선된 사료전환 효율을 보임으로써, 본 발명의 효과를 잘 보여주고 있다.

<162>

(2) 고성장 형질전환 잉어 유도

<163>

본 발명의 미꾸라지 렉틴 유전자 프로모터가 다른 어종인 잉어에서도 활성을 갖는지 여부를 조사하기 위해, 미꾸라지 렉틴 유전자 프로모터와 잉어 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터 pmlectcGH를 잉어 수정란에 이식하였다. 그 실험 및 분석 예는 다음과 같다.

<164>

① 성숙한 잉어 암수 친어로부터 난과 정자를 얻어 인공수정된 수정란을 대상으

로 미세현미주입을 수행하였다. 인공수정은 0.85 % NaCl에 1:5로 희석된 잉어 정액을 잉어 난 500 개당 500 μ l씩 첨가하여 혼합하여 준 후 10 ml의 25 $^{\circ}$ C 물을 첨가하여 수정시키고, 100 ml의 물을 이용하여 세란한 후 25 $^{\circ}$ C 부화조에 수용하였다. 발생이 제 1 세포기에 도달하였을 때 수정난을 12 $^{\circ}$ C 수조로 옮겨 난할을 지연시키고 pmlectcGH의 미세현미주입을 수행하였다. 미세현미주입은 위 (1)에서와 동일하게 수행하였다.

<173> 5 μ M 역위 프라이머 cGH 2R 5 μ l

<174> Taq DNA 폴리머라제(Roche 5 unit/ μ l) 1 μ l

<175> 주형 DNA(1 μ g/ μ l) 1 μ l

<176> (PCR 조건)

<177> 1 사이클: 초기 변성 94 $^{\circ}$ C 2 분.

<178> 30 사이클: 변성 94 $^{\circ}$ C 1 분, 어닐링 58 $^{\circ}$ C 1 분, 연장 72 $^{\circ}$ C 1 분 30 초.

<179> 1 사이클: 최종 연장 72 $^{\circ}$ C 5 분.

<180> 그 결과, 잉어 종묘의 어체중 분포도 정규분포 곡선에서 벗어난 고속성장 개체의 비율은 전체 미세현미주입된 집단 23 %(179/789)에 해당하였다. 이들 고속 성장 개체들을 대상으로 무작위 PCR 분석을 수행한 결과, 98 % 개체들이 혈액 또는 지느러미에 pmlectcGH를 포함하는 형질전환 어류인 것으로 나타나, 본 성장호르몬 발현벡터의 미세현미주입에 의해 성장 가속화 현상이 유도되었음을 잘 보여주었다. 도 13은 pmlectcGH가 이식된 군에서 정규분포를 벗어나는 고성장 잉어의 PCR 분석 결과를 보여주는 사진이다.

<181> ③ 부화 후 4 개월째 PCR에 의해서 형질전환이 재확인된 F0 개체들을 대상으로 무작위 30 미를 선발하여 형질전환 잉어 10 미씩 3 반복구를 설정한 후, 동일 마리수의 대조군과 함께 2x4 M 순환여과식 25 $^{\circ}$ C 탱크에 수용하고 부화 7 개월까지 성장율을 조사하였다. 두 집단 간의 누적 생존율에는 유의적인 차이 없이 모두 95 % 이상의 생존율을 보였다($p>0.05$). 형질전환된 잉어군에서는 대조군에 비하여 유의적인 어체중

증가 현상이 나타났으며, 이러한 현상은 실험 개시 30 일부터 관찰되었다. 실험 종료 시인 부화 7 개월째 두 집단 간의 평균 무게는 3 배 이상 차이가 났다. 도 14는 pmlectcGH가 이식된 부화 7 개월된 형질전환 잉어 및 일반 대조군 잉어의 크기를 비교해서 보여주는 사진이고, 도 15는 pmlectcGH가 이식된 형질전환 잉어 및 일반 대조군 잉어의 성장 곡선을 나타낸 그래프이다.

【발명의 효과】

<182>

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 발현벡터를 이용하면 미꾸라지와 잉어의 생체내에서 다양한 단백질들을 효과적으로 발현시킬 수 있으며, 특히 미꾸라지 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 성장호르몬 발현벡터를 미꾸라지 및 잉어에 이식할 경우, 과도한 성장 가속화로 인한 부작용 없이 안정적인 성장을 향상을 보이고 사료전환효율이 유의적으로 개선된 유용한 형질전환 계통을 생산할 수 있으며, 이로부터 양식 생산성 증대 효과를 얻을 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열 1에 기재된 염기 서열로 표시되는 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절부위를 포함하는 DNA.

【청구항 2】

미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위를 포함하는 발현벡터.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 발현벡터 pmlectP (KCTC 10124BP)

【청구항 4】

제 2 항에 있어서, 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위 및 미꾸라지의 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 발현벡터 pmlectmGH (KCTC 10126BP)

【청구항 6】

제 2 항에 있어서, 미꾸라지의 렉틴 유전자 조절 부위 및 잉어의 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 발현벡터 pmlectcGH (KCTC 10125BP)

【청구항 8】

제 4 항의 발현벡터로 형질전환된 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*).

【청구항 9】

제 6 항의 발현벡터로 형질전환된 잉어(*Cyprinus carpio*).

【청구항 10】

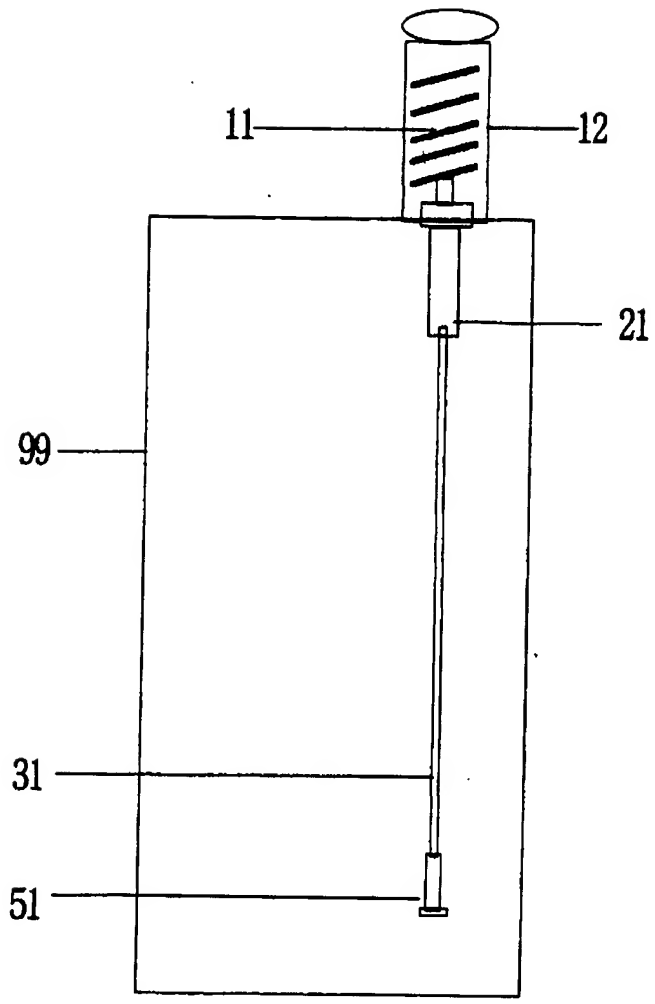
미꾸라지 수정란에 제 4 항의 발현벡터를 미세 주입하여 부화시키는 단계를 포함하는 고성장 형질 전환 미꾸라지의 제조 방법.

【청구항 11】

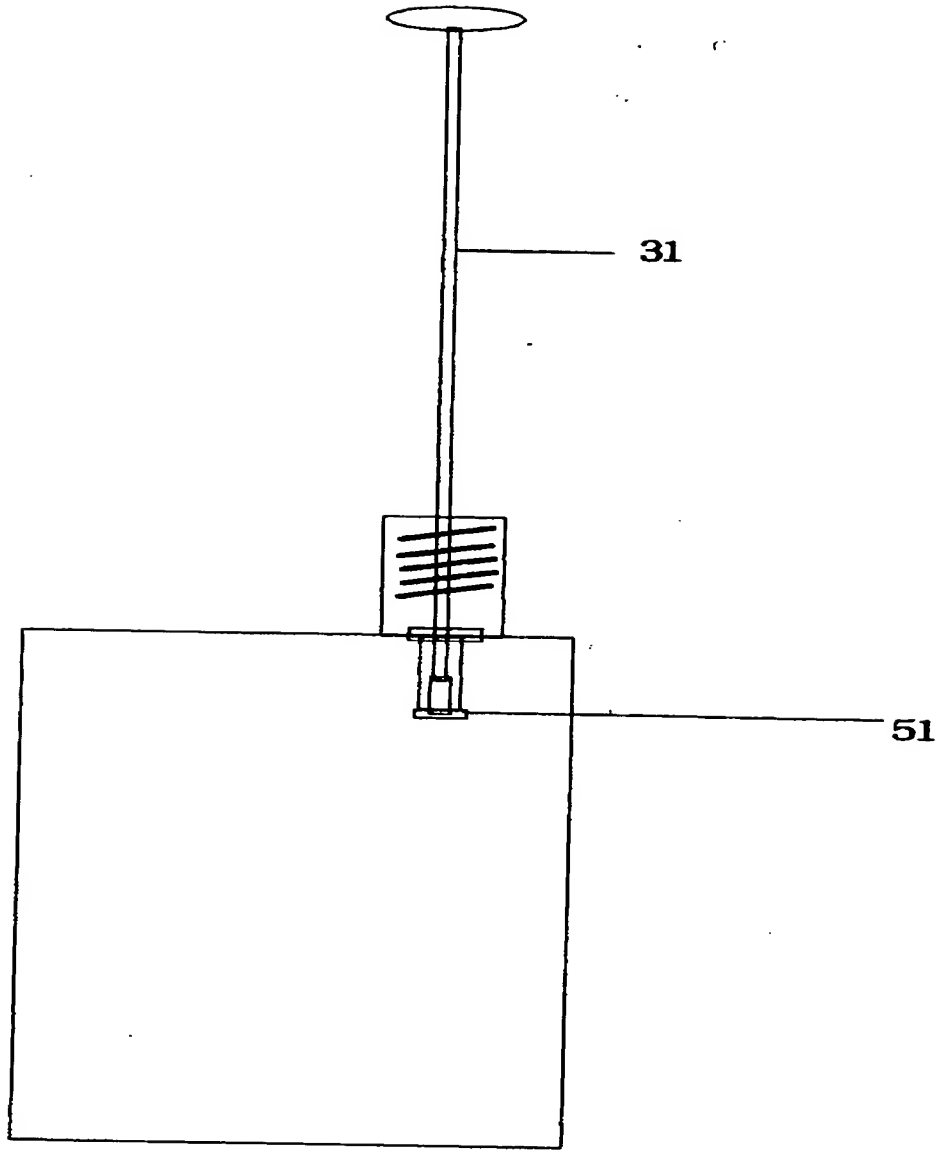
잉어 수정란에 제 6 항의 발현벡터를 미세 주입하여 부화시키는 단계를 포함하는 고성장 형질 전환 잉어의 제조 방법.

【도면】

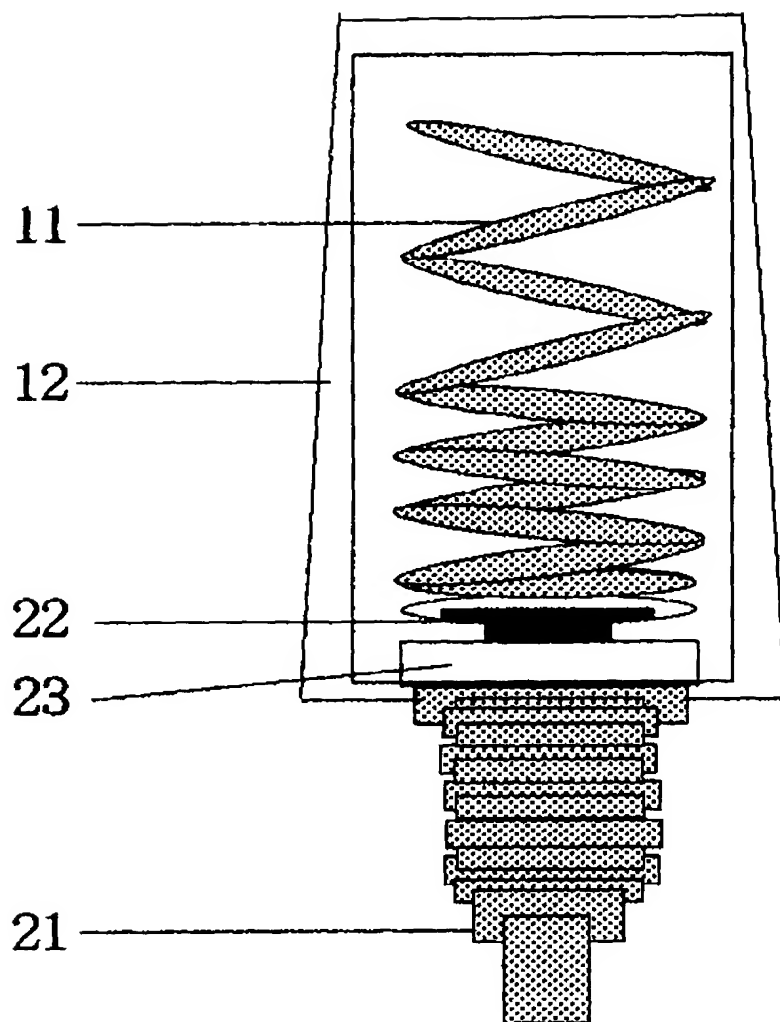
【도 1】



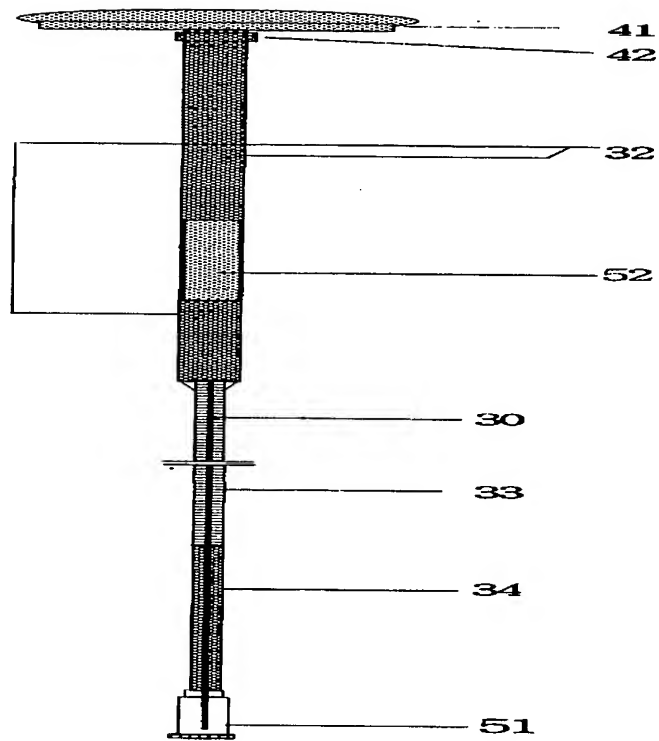
【도 2a】

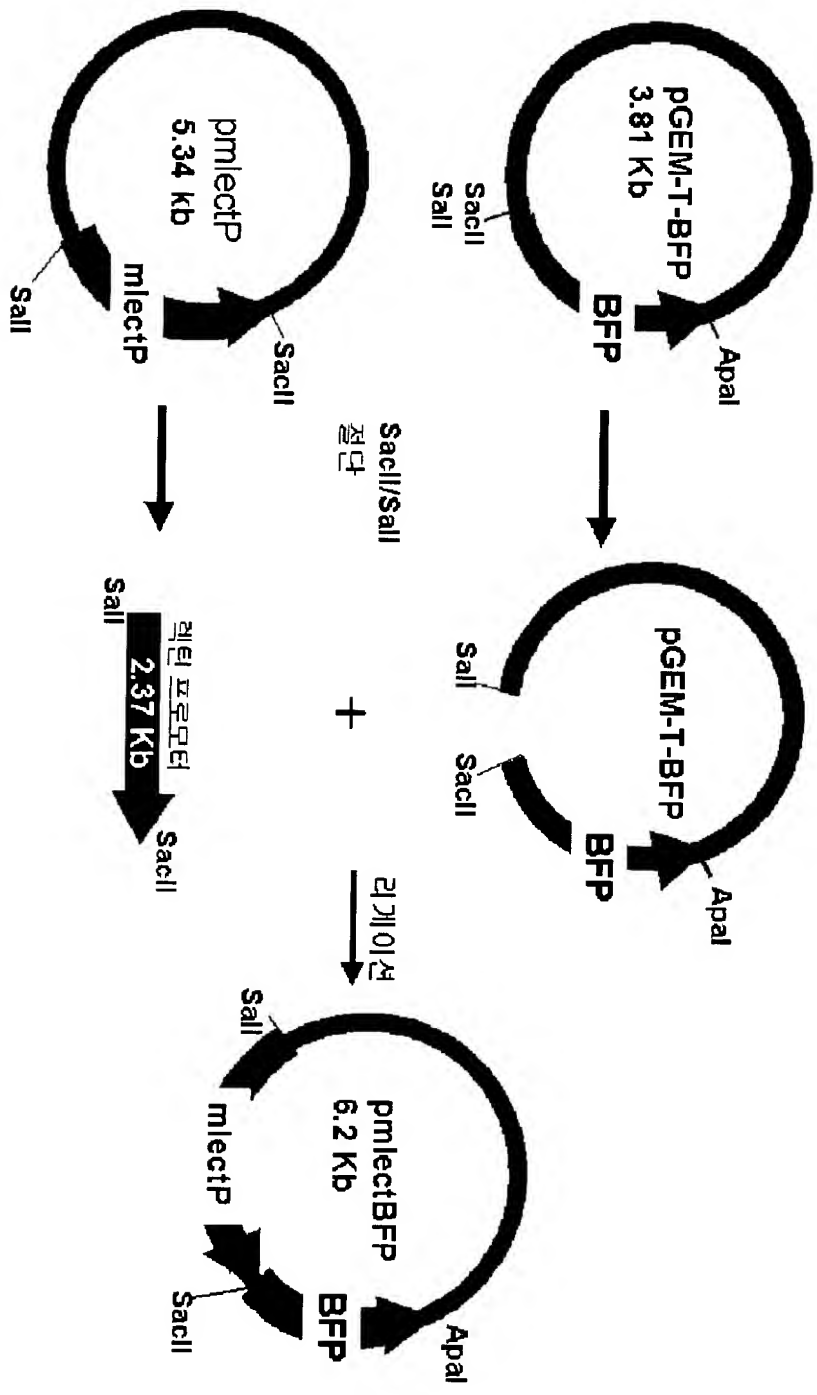


【도 2b】

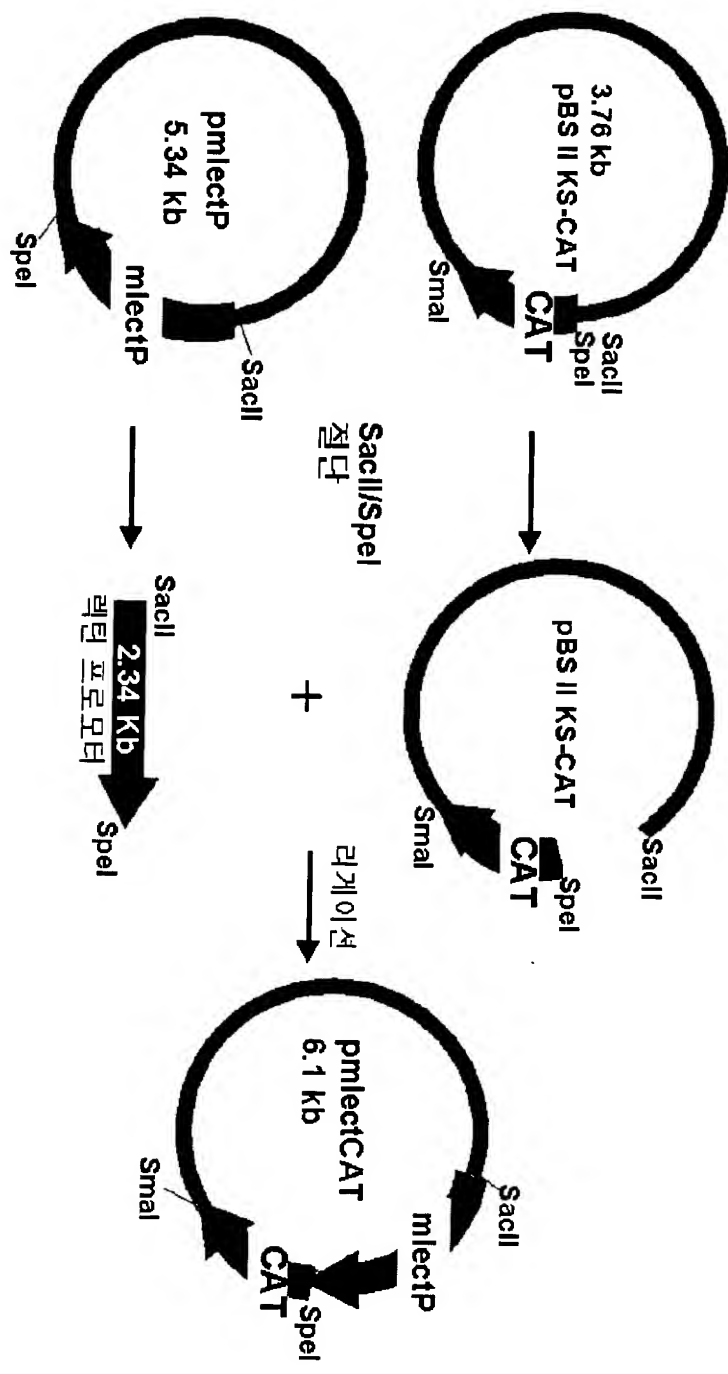


【도 2c】





【도 3】



【도 4】

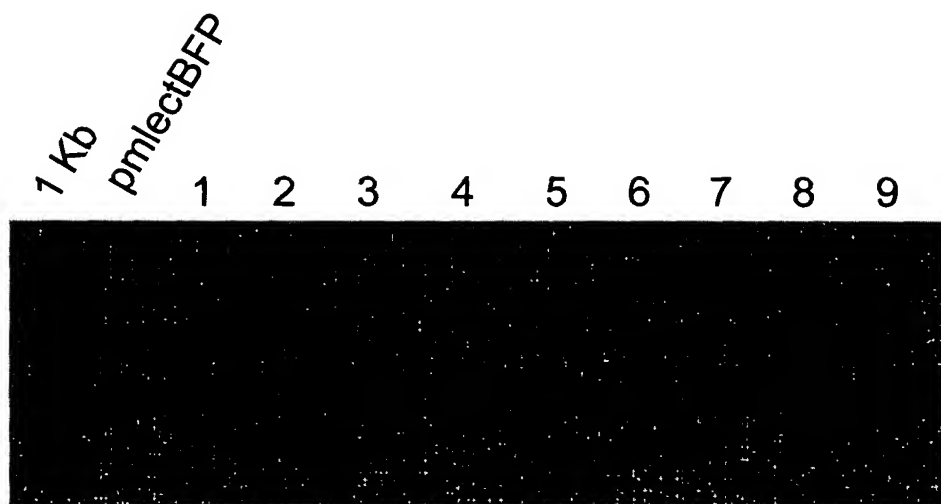
【도 5a】



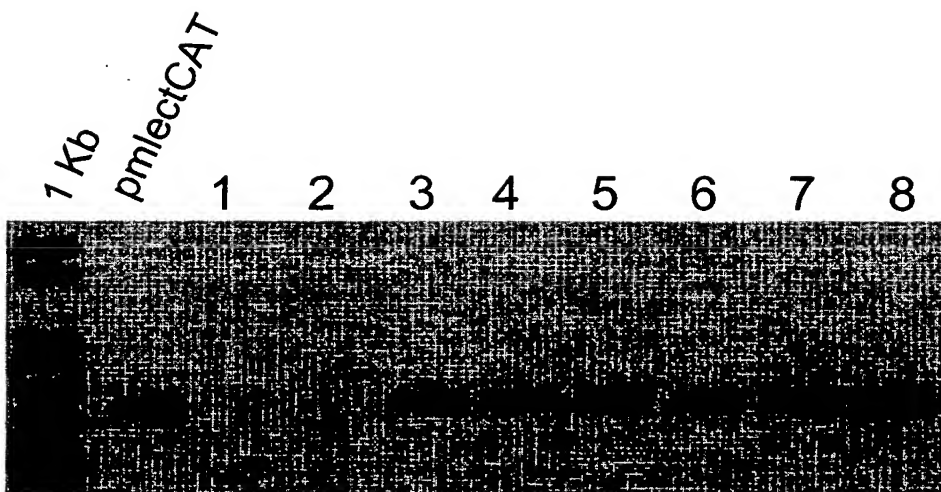
【도 5b】



【도 6a】

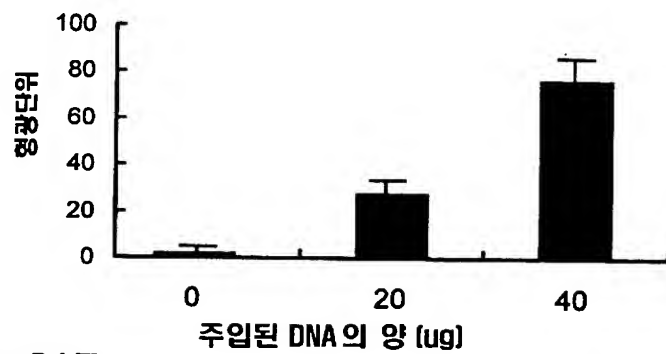


【도 6b】

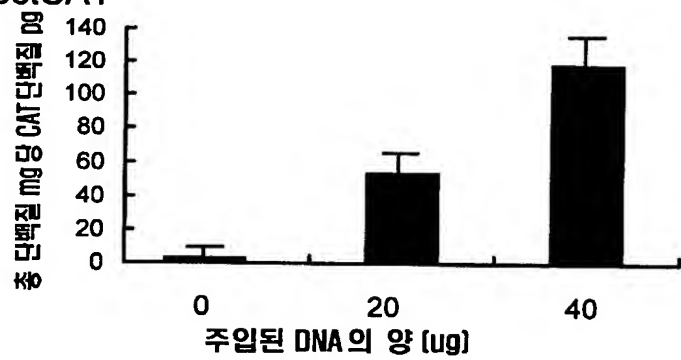


【도 7】

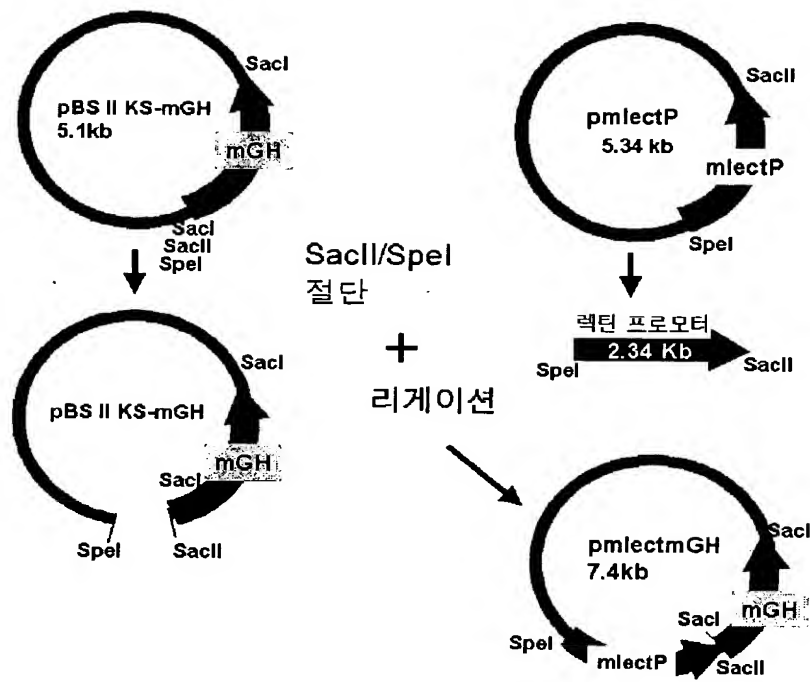
pmlectBFP



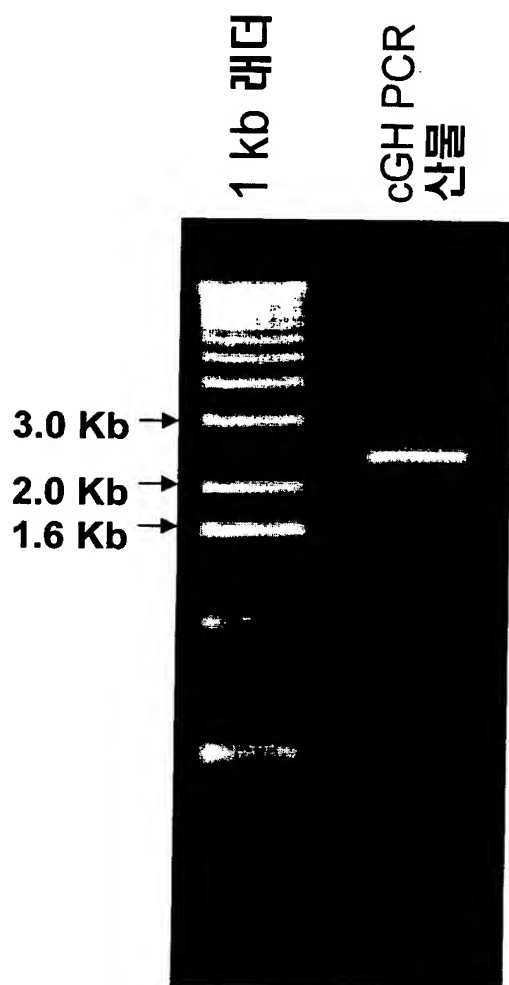
pmlectCAT



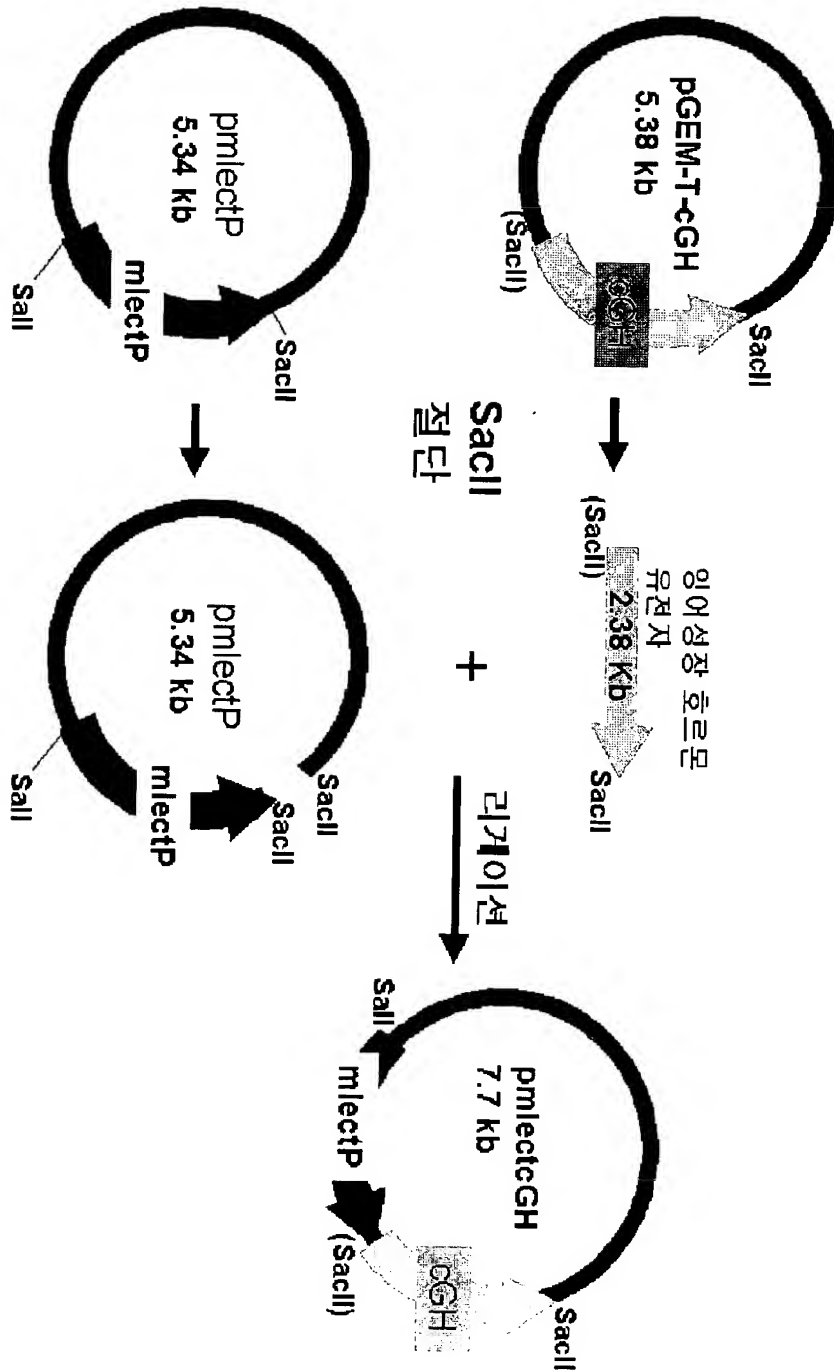
【도 8】



【도 9】



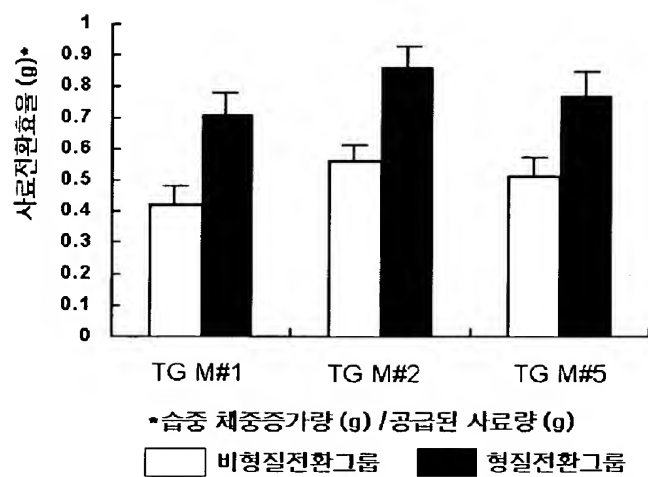
【도 10】



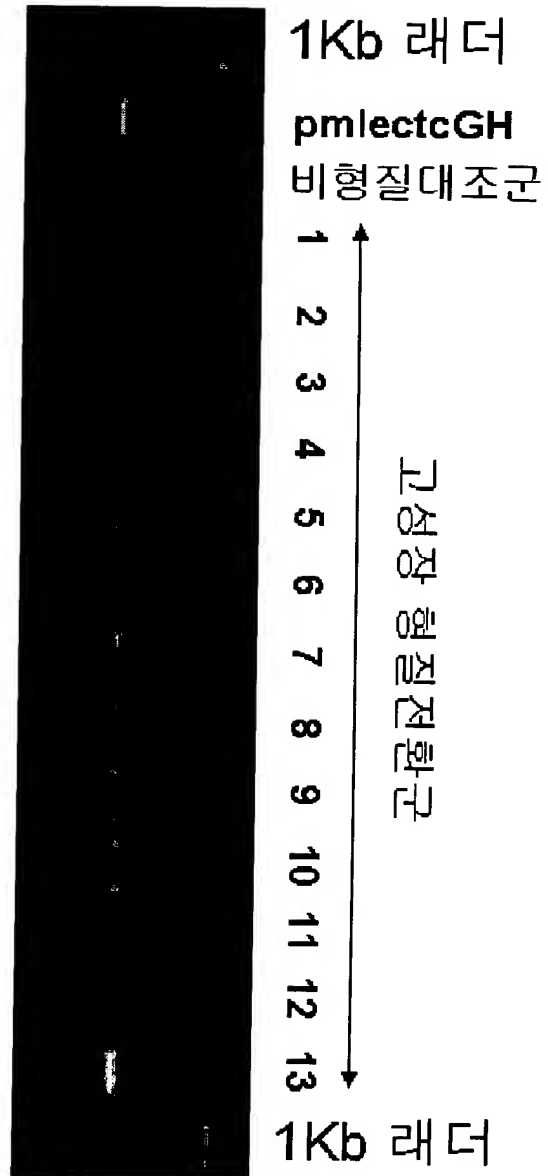
【도 11】



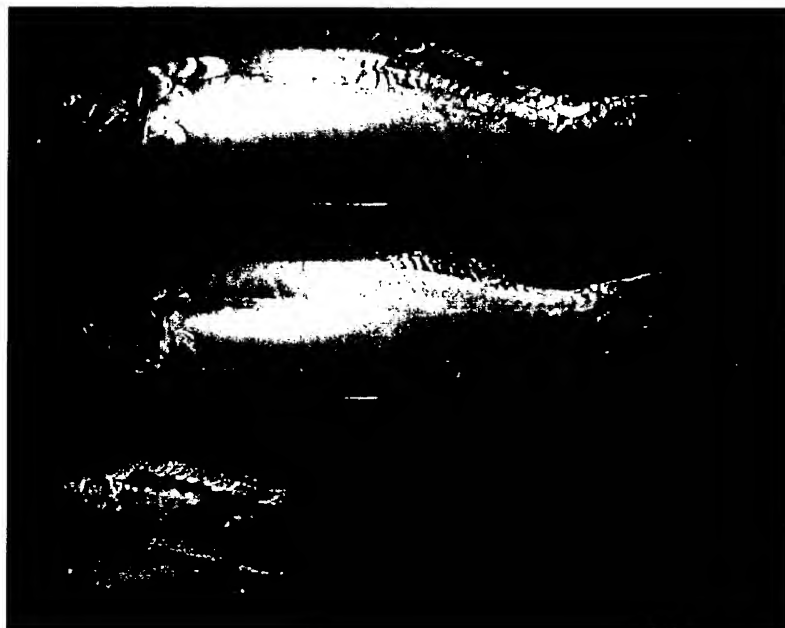
【도 12】



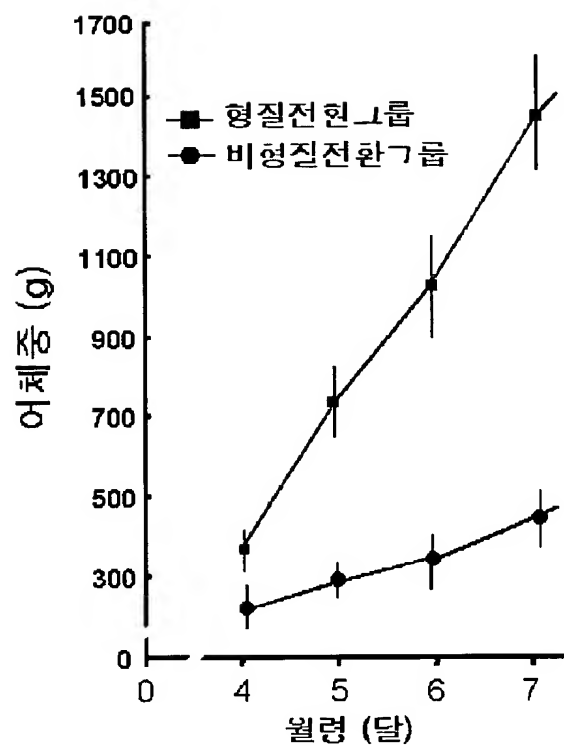
【도 13】



【도 14】



【도 15】



【서열목록】

<110>	KIM, Dong-Soo NAM, Yoon-Kwon NOH, Jae-Koo	
<120>	EXPRESSION VECTOR CONTAINING LECTIN GENE REGULATION SITE OF MUD LOACH	
<130>	PPBA0566	
<160>	18	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	2329	
<212>	DNA	
<213>	Misgurnus mizolepis	
<400>	1	
	aagagtgtgg ctttctaccc agaacattcc gatgcgttcc gtctcgaata aacttgctcc	60
	caaatttatt ggcccgtttt ctgttaccaa gatcattaat ccggtaacag tgcgtctgag	120
	ccttcctccg gcgtacagga gggttcacc tgtgttccac gtctccaata ttaaaccggg	180
	gattttttcc cgtcttaatc cgcctgccc ggttccccc ccgcctcgtc tcgttaatgg	240
	ggaaccgact tattcggtta atcgattct ggactccaga cggaggggac gcggatttca	300
	gtacttggtg gattgggaag gttacggtcc ggaggagaga aggtgggttc ctgctcgga	360
	catactggat caccgcctta tcgatgttta caatcaacag gtaaagcagg ctgggaacgt	420
	caaggggcgt tcctagggga ggggggtactg tcacggtagg aaatcctctg tttcctccgt	480
	gtcatgtttg tgtgtgtgtg tgtttgttac tctctgctct gccatgtgct cgtaggctg	540
	atgtcgtca cctgtgtgtt gattgcctcg ctccagctgc tcatcattac atctctcca	600
	taaatactca catgactctc tgttcctgc cagatgatca ctttctgttt ggtcctcgtg	660
	ttgtgtggtt ctacgtctca gtcttggtt acgagttgca ttgtggattg tttattgtcg	720
	tagtcgtctt cgtgtggatg ttccgtgtac agtctggatt caccactgct caccactcca	780
	ccaacgccgc actcaataac cacctaccac cgtagtcctc gtcaccattg ccaacaacac	840
	cggacatttc ctgcttgtgt catttctctc tttgtgttta taaataaaca ttgtgttttc	900
	acctgcaatt gcttccgctc agttcgtgtc attacaagta cctcaaaata catattagta	960
	tctcaaagg t acatattgct actaaatgtt tacacatctg tacctaattg tccatacaat	1020
	taccttttta aagggtgctg cccagtgac agctagggtta catattttga cttttttcta	1080
	acaatgtagg tcctaaagg t acggtaggct aatctaccca aaattgtatt ctgttttgta	1140
	ttcctgtagg taccaaacag aaacttaggg tacagcccca gtgacagaaa aggtacagtt	1200
	ttgtacctta atttctgaca atgaacgata aacaagaata actaaaacac taccaaata	1260
	tactaaaaac gaaagcataa aaaagatgaa aactaaaatg caaagaaaag aaaactgaag	1320
	tgactgagtt aaatttatgg cagaatgttt cctgtttctg ataagatgaa aaccttactt	1380
	ctaataaccc aaataaccaa ataattatct gcaaacatta aagaaactca gttatgcaat	1440
	ctatggtaaa tagttactga aagaatacac caatgccaaag gtttttgggc aagaggtttg	1500
	tttacatgat atttactttt tgtgtggtca gatgagctgt ccggtgggtg gcccgctggc	1560
	catggttcag gcttttacgt gctgcaaatg ggaatgagtc aggttcagtt caacagcctt	1620
	gaacacgaag tgatgtgaaa tgcgtgatcag ctgttcagct taaaaaaagt tcatttgctg	1680
	ccttaaaaac caactttaaa atattagtgt acacaaacag ttttaaacag tttctcgttt	1740
	tgagtcaact aatattttta agttgaatga actcaaaatt ttaagtcgct ttttaagttg	1800
	aaacatttct ttaccgttta tatcaagcag actgcaataa aactcttaca aaaatgcttc	1860
	tttgcatgat cacacacatt aaagaaacac actaaaaata caaaaataaa caaatctata	1920
	tatgcaatat atttatataa aatacttgca ataacagta aaataacaaa atctaata	1980

aagacatgag tcaataaaaa tatgtaaaac atccataaat gtaaaatata ctgaaagaaa	2040
tgtgaacaca gaaaagtgtt catgtgtcag atcaggatgt ttattttgat aaccatcaca	2100
tttcatcata tattgtatac atatatataa gttcatgata tccagattta cttttcttgt	2160
ttatgttatg gagtccctcc cactgaacaa aagtataaaa gataggactc ctcattgacc	2220
atcacacaat ctacactgaa gttctgaaag tgaagatttg acaaaaagggt gagtttttat	2280
aacattaact tcagcagtggt acatatgagt gcagatgtgt cacttttcc	2329
<210> 2	
<211> 7224	
<212> DNA	
<213> Misgurnus mizolepis	
<220>	
<221> CDS	
<222> (2425)..(2487)	
<220>	
<221> CDS	
<222> (2695)..(2778)	
<220>	
<221> CDS	
<222> (2889)..(3014)	
<220>	
<221> CDS	
<222> (3198)..(3311)	
<220>	
<221> CDS	
<222> (3918)..(3986)	
<400> 2	
caggtagggt cgcgcaccaa ggctaaggcc gatcgccacc agtcgaagcc tccccgttac	60
gtcgtcgggt aaagagtgtg gctttctacc cagaacattc cgatgcgttc cgtctcgaat	120
aaacttgctc ccaaatttat tggcccgttt tctgttacca agatcattaa tccggttaaca	180
gtgcgtctga gccttcctcc ggcgtagagg aggggttcacc ctgtgttcca cgtctccaat	240
attaaaccgg tgattttttc ccgtcttaat ccgcctgccc cggttccccc cccgcctcgt	300
ctcgttaatg gggaaccgac ttattcgggt aatcgtattc tggactccag acggagggga	360
cgcggatttc agtacttggg ggattgggaa ggttacggtc cggaggagag aaggtgggtt	420
cctgctcggg acatactgga tcaccgcctt atcgatgttt acaatcaaca ggtaaagcag	480
gctgggaacg tcaaggggcg ttcctagggg aggggggtact gtcacggtag gaaatcctct	540
gtttcctccg tgtcatgttt gtgtgtgtgt gtgtttgtta ctctctgtc tgccatgtgc	600
tcgttaggct gatgtcgtc acctgtgtgt tgattgcctc gctccagctg ctcattatta	660
catctcctcc ataaatactc acatgactct ctgttccctg ccagatgata actttctgtt	720
tggtcctcgt gttgtgttgt tctacgtctc agtcttggat tacgagttgc attgtggatt	780
gtttattgtc gtagtcgtct tcgtgtggat gttccgtgta cagtctggat tcaccactgc	840
tcaccactcc accaaccgag cactcaataa ccacctacca ccgtagtcct cgtcaccatt	900
gccaacaaca ccggacattt cctgcttgtg tcatttctct ctttgtgttt ataaataaac	960
atttgttttt cacctgcaat tgcttccgct cagttcgtgt cattacaagt acctcaaat	1020
acataattagt atctcaaggg tacataattgc tactaaatgt ttacacatct gtacctaatg	1080
gtccatacaa ttaccttttt aaagggtgct gccccagtga cagctagggt acataatttg	1140
acttttttct aacaatgtag gtcctaaagg tacggtaggc taatctaccc aaaattgtat	1200
tctgttttgt attcctgtag gtaccaaaca gaaacttagg gtacagcccc agtgacagaa	1260
aaggtagagt ttgtacctt aatttctgac aatgaacgat aaacaagaat aactaaaaca	1320

ctaccaaatg atactaaaaa cgaaagcata aaaaagatga aaactaaaat gcaaagaaaa	1380
gaaaactgaa gtgactgagt taaatttatg gcagaatgtt tcctgtttct gataagatga	1440
aaaccttact tctaataacc caaataacca aataattatc tgcaaacatt aaagaaactc	1500
agttatgcaa tctatggtaa atagttactg aaagaataca ccaatgccaa ggtttttggg	1560
caagaggttt gtttacaatga tatttacttt ttgtgtggtc agatgagctg tccggtggtg	1620
ggcccgtcgg ccatggttca ggcttttacg tgctgcaaat gggaatgagt caggttcagt	1680
tcaacagcct tgaacacgaa gtgatgtgaa atgctgatca gctgttcagc ttaaaaaaag	1740
ttcatttgct gccttaaaat ccaactttta aatattagtt gacacaaaca gttttaaaca	1800
gtttctcggt ttgagtcaac taatattttt aagttgaatg aactcaaaat ttaagtgcg	1860
ttttaagtt gaacatttc tttaccgttt atatcaagca gactgcaata aaactcttac	1920
aaaaatgctt ctttgcatga tcacacacat taaagaaaca cactaaaaat acaaaaaataa	1980
acaaatctat atatgcaata tttttatata aaatacttgc aataaacagt aaaataacaa	2040
aatctaagt aaagacatga gtcaataaaa atatgtaaaa catccataaa tgtaaaatat	2100
actgaaagaa atgtgaacac agaaaagtgt tcatgtgtca gatcaggatg tttattttga	2160
taaccatcac atttcatcat atattgtata catatataca agttcatgat atccagattt	2220
acttttcttg tttatgttat ggagtcctc ccactgaaca aaagtataaa agataggact	2280
cctcattgac catcacacaa tctacactga agttctgaaa gtgaagattt gacaaaaagg	2340
tgagttttta taacattaac ttcagcagtg tacatatgag tgcagatgtg tcacttttcc	2400
gtttcattca ttttcagatt catc atg gca gtc atg aga gct ctt gtg	2448
Met Ala Val Met Arg Ala Leu Val	
1 5	
ctt ctt ttc ttg gtc ttt tct gtt gag agt gca cca ggt aac	2490
Leu Leu Phe Leu Val Phe Ser Val Glu Ser Ala Pro Gly	
10 15 20	
caagacgttt acaagattga ccaaaccctg ttaccaatat tccagattaa attcccataa	2550
aattgtgttt tccataaaac ttgttaacaa ttataaacat catgaaagga tgtcaacaga	2610
agcaacattt aaagcactta tagacagaaa cataaaacta ataatgtgac tttatattac	2670
taatatttta atcactgtat agct cat cgc tgc cca cat gga tgg aca	2718
His Arg Cys Pro His Gly Trp Thr	
1 5	
ccc ttt ggt gtg caa tgc tac aaa ttc ttc tct cag tca gtt gac tgg	2766
Pro Phe Gly Val Gln Cys Tyr Lys Phe Phe Ser Gln Ser Val Asp Trp	
10 15 20	
atc aca gct gag gt actgtttattc agttattcaa attgttgaat aagaatactc	2820
Ile Thr Ala Glu	
25	
aatgtcatga tccaagctga aacagattag attttatatt tgcaataaaa taatctctct	2880
ctcttttag aaa aac tgt caa tct att gat gct aat ctt gca tct gtg cgc	2930
Lys Asn Cys Gln Ser Ile Asp Ala Asn Leu Ala Ser Val Arg	
1 5 10	
agt aca atg gaa cac aac ttt ctc ctg agt ctg att gtg tct gct aac	2978
Ser Thr Met Glu His Asn Phe Leu Leu Ser Leu Ile Val Ser Ala Asn	
15 20 25 30	
aca cgt gtt tgg att ggt ggc cat gat ggt gaa act gtaagt cattttgctc	3030
Thr Arg Val Trp Ile Gly Gly His Asp Gly Glu Thr	
35 40	
tgaaatgctg atattgtcat ggetagtctg aaattaatgc ttttaattata aaactgattt	3090
ttctatagat acaataacta aatgcttttt gttacaatat aaatgattga attatatcat	3150

aatgaaaag attattagta aactctttga ctctctcac tcattag	gaa gga caa	3206
	Glu Gly Gln	
	1	
tgg ctg tgg tct gat gga tct caa ttt cac ttt acc aac tgg tgc cct		3254
Trp Leu Trp Ser Asp Gly Ser Gln Phe His Phe Thr Asn Trp Cys Pro		
5 10 15		
gga gaa cct agc aat aat ttt ggt aaa gag aac tgc ctg gag ata aac		3302
Gly Glu Pro Ser Asn Asn Phe Gly Lys Glu Asn Cys Leu Glu Ile Asn		
20 25 30 35		
ttt aca cgt aagaaagtc tcatatcatt attgttttta tttaaatct taaaattcta		3360
Phe Thr Arg		
tagcatttg tattaaattt acttgtttta tgtcagaaaa tgctacgtgc agtgtattca		3420
ctacattcag atccctttaa cctttcagtg ttgtattttt gcagcctgat ggtacaattg		3480
tttgaattca tacttgggtc ccataatga aaaagtgaac acagaatttt ataatgtct		3540
gtaaaaaatt ttaaaagaaa aaatgtcaca ttactgtat ttaaccaag ggtgccaaac		3600
tctgtcttgg agggccgggtg gtgacctgtg tagtttagct ctaacactaa tcaaacacac		3660
ctaaagcagt ttattaaagt ctaactaagc atactagaaa cttctagaca ggtgagctga		3720
gacaagtga aactaaactc tgcaggacac cgggcctcta ggaacgagtt tgggcacccc		3780
tgatttagac cctttgcaac aacacttgaa atttgcctca gatgcctctt gatcgttgc		3840
gatttataca ttattttta ttcaactac accggtaatg atcagtactg attttatttt		3900
catcttatcc cacagag aac cgt tgc tgg aat gat gcg gat tgt tca acc		3950
Asn Arg Cys Trp Asn Asp Ala Asp Cys Ser Thr		
1 5 10		
aca atc agc tac att tgt gcc caa cct att aga tca tgaa aaatcaatct		4000
Thr Ile Ser Tyr Ile Cys Ala Gln Pro Ile Arg Ser		
15 20		
gtttcaaaagt actatgattt tactacatgc ctatacattt tttctgac tttattctta		4060
aactcagtat cttactgaag cttctgaaa acttctccaa tcaataaaaag cttttataaa		4120
gcaaattgtt tgcattgttg agtcaaaaaa attaatcctc aaattaaata caatataaaa		4180
caaaacaaca atacatctaa aataacaaaa agggctttca caattgaaat agttaacctc		4240
aggttattct aaacccagg tttaaagaat cctgggttat ctgttcacg ttccacactg		4300
ttcatactta accaggagg aaagaaataa ccctgggtat tcataatctg atgtttcaca		4360
ctgtgcattt ctaaacctta agttaatgtt ttcatittga tatttggggg gtcagcaatt		4420
taaggaagtt tcttcacctc ctattagca tccagacagc agaagtaggg aactgagcag		4480
cgttcacgac tgaggttctc ttcagaacaa ctgaagtaca ttgagactaa tccatgtaag		4540
agattcctcc acagccagtg gcatgtttac cttttgggg gtcctaagca aagttcaaga		4600
accggggccc cccatgccc agcattgccc aaggtttttc atttgaattg cacaacaata		4660
acattcagta tacagaatta agttagatat atataaacg ggtttattta gttgtacctt		4720
gcttaaagta aactaaatt gttacagtat gacaaagatt cttatagatt catatataga		4780
tgtcttagga tgtattttaa acaatgtaat taatactgca acttcagtgt ctgacatctt		4840
actaaaaaaa ctaaatgagg aaaaagagga agcattagat tatgattcag actggtctaa		4900
caaacaccag caaacaatat tgtaagttgg ttaatgcttg acttaatgga tgggaatcac		4960
ataactctca tgttcattt gcaaaaacaa acttactgtg agatacaaca agcatataga		5020
ctagacatac actaaagatg agattttaat gacaatgat agatacagaa tatgatttat		5080
gtattttcga catgtgtggt gtctttatca tgttaatacc tgtacgagca tggacaacaa		5140
gatgcgtgaa tgttgtgagc ttatgagagc aaagatagag tctgttgagc gctcattcca		5200
gcacttgtgt ggctgcattt gtgcgcgtg agcagaggtc cgctttcccg tagagcttcg		5260
ttcatgaagt agcctttatg tgccttgca aggatgtggg caaatattat tctgcgtgca		5320

tactcacaca tctctccctc gcacgtgctt tatccgtacc ttagatttgg ttctgaataa 5380
acctaacata ctttcgcaca ctttgtggcc agtagggggc ccccaagcct gcgggcccta 5440
cgcaattgca tggtttgcgt ggtgggtaaa cagccactg gttacattgc aagatacttt 5500
glaaaaaat gttaatctgt taatagtgc ctattttaac aatctaagt catggtctaa 5560
agtgcaaaag ggtttgtcct aatccacttc tgctaattta acgacgggac aaattttggg 5620
gcgtctagcg cactgtctta aagggttgtt cctattctag taatgagtaa tgggtgtgtt 5680
ttgggcatga gttcgattca atgttattta tataaagctt ttcacaattg ttttaattgtt 5740
tcaaagcagc ttacattaa aatatatatt actgtttttt taaactgatg taagattgac 5800
acgaacagtg attgttgatt tgtatgtgca tcaaggcaag gcaagttaa ttgtatagca 5860
catttcatc acagagggtc ttcaagggtc tttacataga aatgagaaaa caatatatga 5920
gaaaaaaagt atgtagaaaa aaatcaaaga tacatttgaa tttaaaatat caattaaaag 5980
aaaaataatg tgattttaat agaaactgtt taaatgtgtg aaaaaataa agtataaaac 6040
agtaaaaaaa aattattatt atttagctca gtgggacct atacaggttg aacaggagt 6100
cttcggacaa cctgacaatt gtcagaatag atcagagaat tgcctggaaa taaactttg 6160
aagtaagaat gtctattatt attgttttta ttataactct aacattttat aggatttagt 6220
acacaataag ccagtttagc tgtcagaaaa tgttagctgc agtgcattca ctacattcag 6280
atccctttca ttttattttg ttcaatgttg ttagttagt ttgacacgag caccaattaa 6340
tttagtgatt ttcatatggg caaccattgg ttagtagtat gccatacaca ggacactaga 6400
ggtttcagaa gtacatgctg ggaccaaaga gacctatta gtactgtcac ggtaggaaat 6460
cctctgttct ctcgtgtgca tgttgtgtg tgtgtgtgtt tgttactctc tgctctgcca 6520
tgtgtcgtt aggtcatgt cgctcacctg tgtgttgatt gcctcgctcc agctgctcat 6580
cattacatct cctccataaa tactcacatg actctctgtt ccctgccaga tgatcacttt 6640
ctgtttggtc ctcgtgttgt gtggttctac gtctcagttc tggattacga gttgcattgt 6700
ggattgttta ttgtcgtcgt cgtcttcgtg tggatgttcc gtgtacagtc tggattcacc 6760
actgtccacc actccaccaa cgccgcactc aataaccacc taccaccgta gtcctcgtca 6820
ccattgccaa caaccacgga catttcctgc ttgtgtcatt tctctctctg tgtttataaa 6880
taaacttgtt gttttcacct gcaattgctt ccgtcagtt cgtgtcatta cagaatcatc 6940
tggccataca tgggaagcagc aggagaccaa cccacggcca cgctggagga atttctccag 7000
cgaactctgg ctcgtatgga tcttcaggac cagtcgatca acgaaatgcg ataggccgtc 7060
catgcaatga tgacgaaggt gtccgagctc tctcagcgtt cctctcatcc ttcgcctccc 7120
actgcgccac ccacaccgc cgaccatct tctctccaa ggggtgtgtt tcctccggag 7180
ccccgattac cgatccctga gaaatactcc ggtgagccaa atta 7224

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Misgurnus mizolepis

<400> 3

Met Ala Val Met Arg Ala Leu Val Leu Leu Phe Leu Val Phe Ser Val

1 5 10 15

Glu Ser Ala Pro Gly

20

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Misgurnus mizolepis

<400> 4

His Arg Cys Pro His Gly Trp Thr Pro Phe Gly Val Gln Cys Tyr Lys

1 5 10 15

Phe Phe Ser Gln Ser Val Asp Trp Ile Thr Ala Glu
 20 25

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Misgurnus mizolepis

<400> 5

Lys Asn Cys Gln Ser Ile Asp Ala Asn Leu Ala Ser Val Arg Ser Thr
 1 5 10 15

Met Glu His Asn Phe Leu Leu Ser Leu Ile Val Ser Ala Asn Thr Arg
 20 25 30

Val Trp Ile Gly Gly His Asp Gly Glu Thr
 35 40

<210> 6

<211> 38

<212> PRT

<213> Misgurnus mizolepis

<400> 6

Glu Gly Gln Trp Leu Trp Ser Asp Gly Ser Gln Phe His Phe Thr Asn
 1 5 10 15

Trp Cys Pro Gly Glu Pro Ser Asn Asn Phe Gly Lys Glu Asn Cys Leu
 20 25 30

Glu Ile Asn Phe Thr Arg
 35

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Misgurnus mizolepis

<400> 7

Asn Arg Cys Trp Asn Asp Ala Asp Cys Ser Thr Thr Ile Ser Tyr Ile
 1 5 10 15

Cys Ala Gln Pro Ile Arg Ser
 20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplifying a lectin gene regulation site of a mud
 loach

<400> 8

ggaaaagtga cacatctgc

19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplifying a lectin gene regulation site of a mud

loach	
<400> 9	
ggaaaagtga cacatctgc	19
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for detecting a BFP gene	
<400> 10	
ggccacaagt tctctgtcag tg	22
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for detecting a BFP gene	
<400> 11	
gggcagattg tgtggacagg	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for detecting a CAT gene	
<400> 12	
ctataaccag accgttcagc	20
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for detecting a CAT gene	
<400> 13	
cgcggcgccc tgccactcat cgcag	25
<210> 14	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for amplifying a growth hormone gene of a carp	
<400> 14	
ccgcggacaa acattcaciaa gctcttaact aag	33
<210> 15	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> primer for amplifying a growth hormone gene of a carp
 <400> 15
 ttctctatta aagttttaaa ttgcatcca 29
 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer for detecting a lectin gene regulation site of a mud loach
 <400> 16
 gttatggagt ccctccac 19
 <210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer for detecting a growth hormone gene of a mud loach
 <400> 17
 cagccagctg gtgcaggtg 19
 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer for detecting a growth hormone gene of a carp
 <400> 18
 acaacacctg caccagctgg ctg 23